

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
Dipartimento di Medicina Sperimentale



Scuola di Dottorato in Medicina Sperimentale
Indirizzo: Patologia molecolare e cellulare di malattie correlate
all'invecchiamento
XXXI ciclo

**Il ruolo del cGMP e di A β nei processi di
formazione della memoria**

**Caratterizzazione di nuovi HAT attivatori
per la terapia della malattia di Alzheimer**

Candidata Dr.ssa Elisa Calcagno

Tutore Prof.ssa Roberta Ricciarelli

Co-Tutore Prof. Ottavio Arancio

Coordinatore Prof. Giambattista Bonanno

Anno accademico 2017-2018

INDICE

<i>Nota dell'autore</i>	5
Introduzione	6
La Malattia di Alzheimer	7
AD: forme cliniche	7
AD: alterazioni macroscopiche e microscopiche	8
La β -amiloide	10
Biologia cellulare e processing proteolitico	10
Il ruolo di A β nell'AD	13
Meccanismi molecolari della memoria	16
Memoria e apprendimento	16
Long Term Potentiation (LTP)	18
Capitolo 1: Il ruolo del cGMP e di A β nei processi di formazione della memoria	20
1.1. Background molecolare	21
1.1.1. Guanosina monofosfato ciclico (cGMP) e memoria	22
1.2. Scopo della ricerca	26
1.3. Materiali e metodi	29
1.3.1. Colture cellulari e trattamenti	30
1.3.2. Modelli animali	31
1.3.3. Preparazione delle sezioni di ippocampo	32
1.3.4. Test ELISA per A β	32
1.3.5. Preparazione degli estratti proteici	33
1.3.6. SDS-PAGE ed immunoblot	33
1.3.7. Valutazione dell'attività enzimatica della γ -secretasi (Exo-cell assay)	35
1.3.8. Valutazione dell'attività enzimatica di BACE	36
1.3.9. Quantificazione del contenuto intracellulare di cGMP	36
1.3.10. RNA interference	37
1.3.11. Saggio di interazione tra APP e BACE	37
1.3.12. Esperimenti di elettrofisiologia	38
1.3.13. Object recognition test (ORT)	39
1.3.14. Analisi Statistica	40

1.4. Risultati.....	41
1.4.1. L'aumento del cGMP determina l'incremento dei livelli di A β	42
1.4.2. Il cGMP non modifica l'espressione di APP	45
1.4.3. La produzione di A β indotta dal cGMP non é mediata dalle PKG.....	47
1.4.4. L'effetto del cGMP sulla produzione di A β necessita di β - e γ -secretasi.....	49
1.4.5. Il cGMP stimola la produzione di A β favorendo la convergenza di APP e BACE-1 nei compartimenti endolisosomiali	52
1.4.6. Il cGMP richiede A β per sostenere la late-LTP.....	55
1.4.7. Il cGMP richiede A β per migliorare la performance cognitiva	58
1.5. Discussione	61
Capitolo 2: Caratterizzazione di nuovi HAT attivatori per la terapia della malattia di Alzheimer	67
2.1. Background molecolare	68
2.1.1. Epigenetica	69
2.1.2. Acetilazione	71
2.1.2.1. HDAC.....	73
2.1.2.2. HAT	75
2.1.2.2.1. CBP e p300	80
2.1.3. L'acetilazione degli istoni nell'attività neuronale.....	82
2.2. Scopo della Ricerca.....	89
2.3. Materiali e Metodi.....	93
2.3.1. Composti testati	94
2.3.2. Saggi dell'attività istone-acetilasica (H3) di p300 a livello della Lys18 (K18) e della Lys27 (K27).....	97
2.3.2.1. Enzimi e substrati.....	97
2.3.2.2. Condizioni sperimentali.....	97
2.3.2.3 SDS-PAGE ed immunoblot.....	98
2.3.2.5 Analisi dei dati.....	99
2.4. Risultati	101
2.4.1. Effetto dei singoli composti sull'attività enzimatica di p300	102
2.4.1.1. YF2.....	102
2.4.1.2. HAT attivatori a livello di entrambi i siti lisinici di H3: RA010115, RA010171, RA010900 attivano l'acetilazione di H3K18 e H3K27	104
2.4.1.3. HAT attivatori a livello di uno dei due siti lisinici di H3: JF9 attiva l'acetilazione della Lys18 (H3K18), RP23 attiva l'acetilazione della Lys27 (H3K27).....	105

2.4.1.4. HAT inibitori a livello di entrambi i siti lisinici di H3: JF1, JF5, JF7, JF10 inibiscono l'acetilazione a livello dei siti H3K18 e H3K27	106
2.4.1.5. HAT inibitori a livello di uno dei due siti lisinici di H3: JF3 e JF16 inibiscono l'acetilazione del sito H3K18, JF6 e RP14 inibiscono l'acetilazione del sito H3K27	107
2.4.1.6. JF4, RP58, RP59, RA010143, RA010146, RA010165, RA010168 e RA013886 non hanno alcuna attività.....	108
2.4.2. Effetto dei composti sull'attività enzimatica di p300	109
2.5. Discussione	111
Bibliografia	117
<i>Pubblicazioni</i>	133

Nota dell'autore

Questa tesi è divisa in due capitoli. Il primo capitolo tratta l'argomento della ricerca di cui mi sono occupata durante i primi due anni del Corso di Dottorato, svolti presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Sperimentale, sotto la diretta supervisione del mio Tutor, la prof.ssa Roberta Ricciarelli.

Ho trascorso il terzo ed ultimo anno di Corso alla Columbia University di New York, USA, presso i laboratori del Taub Institute nel gruppo diretto dal prof. Ottavio Arancio. Qui ho affrontato aspetti della ricerca di base sulla malattia di Alzheimer che, sebbene non strettamente correlati ai precedenti, hanno condotto ai risultati riportati nel secondo capitolo di questa tesi.

Introduzione

La Malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa progressiva (Kirson, Desai et al. 2016) che si manifesta con un deterioramento delle funzioni cognitive, in particolare della memoria, ed un'alterazione delle funzioni neuronali, che causano difficoltà nello svolgimento delle normali attività della vita quotidiana (Cummings 2004, Han 2014). È una malattia a eziologia ancora in gran parte ignota, caratterizzata dalla perdita dell'autonomia funzionale, disturbi del comportamento e del sonno, e sviluppo di allucinazioni. Questa sintomatologia è riconducibile alla distruzione dell'attività neuronale in quelle regioni cerebrali che sovrintendono alla memoria e all'apprendimento, alle reazioni emozionali e al comportamento (Cazarim Mde, Moriguti et al. 2016).

AD: forme cliniche

Dal punto di vista clinico si distinguono due forme differenti della patologia: la forma sporadica, e la forma familiare. La forma sporadica (SAD), ad esordio tardivo, è la più comune e comprende circa il 95% dei casi, ma l'eziologia di questa forma resta ancora ignota e la patogenesi deve essere ancora definita con esattezza. Per quanto riguarda invece la forma familiare (FAD), caratterizzata da trasmissione autosomica dominante ed esordio precoce (prima dei 65 anni), sono disponibili maggiori informazioni; infatti, i geni direttamente responsabili dell'insorgenza di questa forma sono stati individuati da tempo.

La prima mutazione genetica legata alla demenza è stata identificata sul cromosoma 21, nel locus che codifica per la proteina precursore dell'amiloide (APP), una proteina integrale di membrana espressa in molti tessuti e altamente concentrata a livello sinaptico (Levy, Carman et al. 1990). In seguito, sono state identificate altre due mutazioni che coinvolgono i geni responsabili della produzione di A β , quali la presenilina 1 (PS1), sul cromosoma 14, e la presenilina 2 (PS2), sul

cromosoma 1. Ad oggi, le mutazioni che interessano questi tre geni rappresentano la causa più comune di AD ad esordio precoce.

AD: alterazioni macroscopiche e microscopiche

Gli aspetti neurobiologici che caratterizzano la malattia consistono in alterazioni macroscopiche e microscopiche.

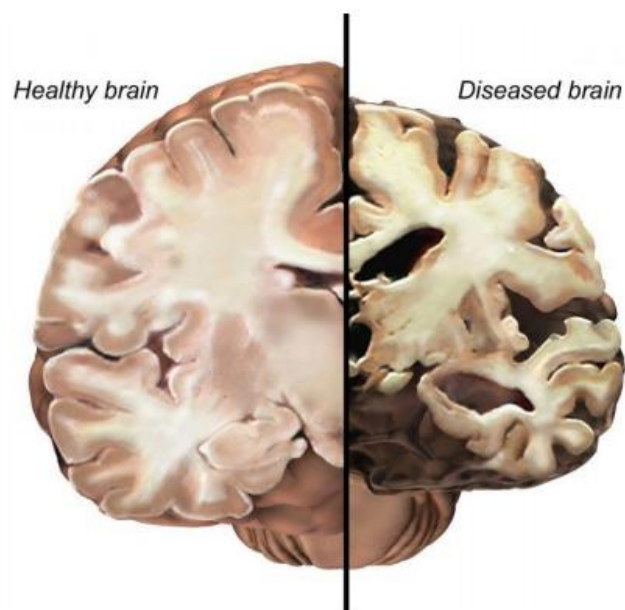


Fig. 1 - Alterazioni morfologiche di un cervello con Alzheimer

La caratteristica macroscopica più evidente del cervello di un soggetto affetto da AD è la marcata atrofia corticale, che determina un'aumentata ampiezza dei solchi cerebrali e l'incremento del volume ventricolare, come illustrato in Fig. 1.

Questa atrofia appare diffusa ed è legata principalmente alla degenerazione neuronale, che comporta la riduzione del numero di spine dendritiche e di giunzioni sinaptiche, fino ad una vera

e propria scomparsa della cellula nervosa, fenomeno questo che si determinerebbe attraverso un processo apoptotico.

Fra le strutture principalmente interessate, oltre al lobo temporale, vi sono le aree associative corticali, l'ippocampo ed il giro para-ippocampale, con un relativo risparmio delle aree posteriori degli emisferi, del cervelletto e del tronco encefalico (Schott, Fox et al. 2003).

Le alterazioni istopatologiche che caratterizzano la malattia sono state descritte per la prima volta nel 1906 dal neuropatologo tedesco Alois Alzheimer e sono le placche neuritiche e i grovigli neurofibrillari (Fig. 2) (Alzheimer, Forstl et al. 1991).

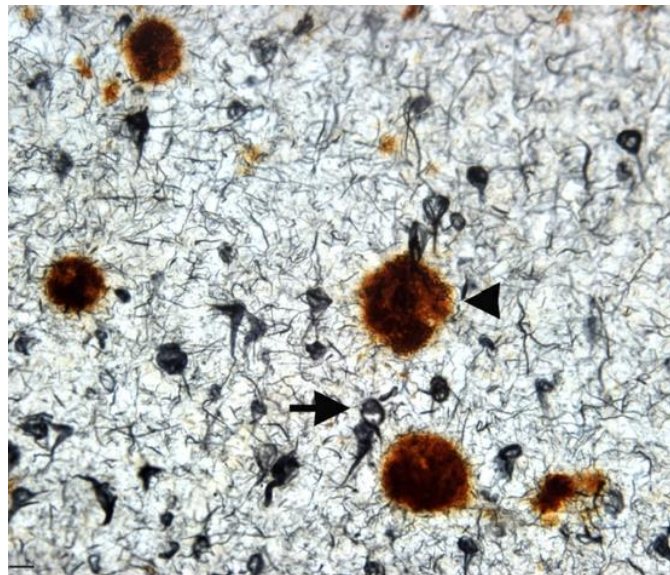


Fig. 2 – Placche neuritiche e grovigli neurofibrillari

Immunoistochimica di una sezione di ippocampo. L'anticorpo anti-beta-amiloide evidenzia le placche neuritiche (in marrone), mentre l'anticorpo anti-PHF-1 evidenzia i grovigli neurofibrillari (in nero).

Le placche neuritiche, dette anche placche senili (SP, dall'inglese *senile plaques*), sono strutture a localizzazione extracellulare di forma rotondeggiante, con un diametro di 50-200 μm , che si sviluppano in alcune aree del cervello come l'ippocampo, il paraippocampo e l'amigdala. Le

placche comprendono una zona centrale, costituita principalmente da aggregati fibrillari di un peptide di 40-42 amminoacidi (aa) chiamato β -amiloide ($A\beta$), circondata da neuriti distrofici con prolungamenti assonali tortuosi e dilatati. Attorno alle placche sono frequentemente presenti due tipi di cellule gliali attivate: le cellule microgliali e gli astrociti.

I grovigli neurofibrillari (NFT, dall'inglese neurofibrillary tangles), sono strutture costituite da fasci di filamenti elicoidali appaiati, formati dalla proteina citoscheletrica tau iperfosforilata. Essi si accumulano nel corpo cellulare dei neuroni, prevalentemente nell'ippocampo, nella corteccia entorinale, nell'amigdala e nei nuclei del proencefalo basale.

La β -amiloide

Biologia cellulare e processing proteolitico

Il principale costituente delle placche neuritiche è un peptide che deriva dalla proteolisi della proteina precursore dell'amiloide (APP). Quest'ultima è una glicoproteina transmembrana di tipo I costituita da 639-770 aa e altamente espressa a livello del sistema nervoso centrale, dove esercita numerose funzioni fisiologiche (Muller and Zheng 2012). La sua struttura presenta una larga porzione extracellulare, un dominio transmembrana ed un breve terminale carbossilico intracitoplasmatico chiamato APP Intracellular Domain (AICD).

APP subisce un processo di frammentazione che coinvolge tre enzimi: α -, β - e γ - secretasi.

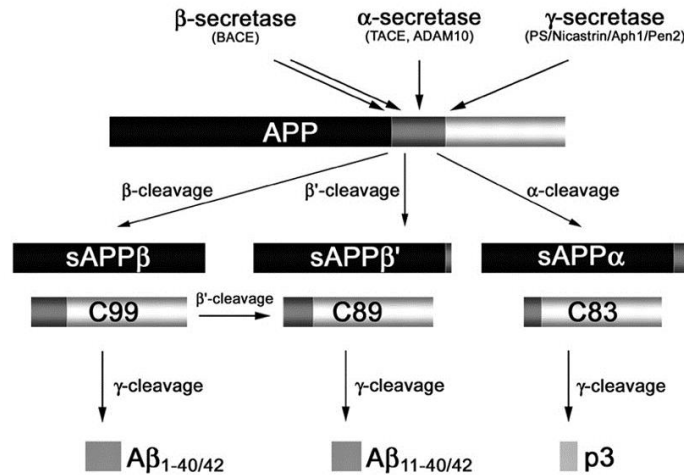


Fig.3 – I diversi tagli proteolitici di APP

In condizioni fisiologiche, APP subisce prevalentemente il *processing* non amiloidogenico, operato dalla α -secretasi e, in rapida successione, dalla γ -secretasi. Il taglio α -secretasico, che avviene tra i residui amminoacidici 16 e 17 (K-L) della sequenza di A β , genera un frammento solubile extracellulare chiamato sAPP α ed un frammento carbossi-terminale di 83 aa chiamato C83, che rimane ancorato in membrana. Il C83 viene ulteriormente processato dalla γ -secretasi, con il conseguente rilascio del peptide P3 e del dominio intracellulare AICD (Passer, Pellegrini et al. 2000), entrambi degradati rapidamente. Questo pathway proteolitico preclude la formazione di A β perchè la α -secretasi taglia APP all'interno della sua sequenza amiloidogenica. Alternativamente, APP può seguire la via di degradazione che porta alla formazione A β . In questo caso, APP viene processata dalla β -secretasi (una aspartil-proteasi anche detta BACE, dall'inglese β -site APP Cleaving Enzyme) a livello del sito di taglio Asp1, o meno frequentemente Glu11, all'interno della sequenza di A β . Questo taglio genera un frammento solubile extracellulare chiamato sAPP β ed un frammento carbossi-terminale di 99 aa chiamato C99, quando il taglio avviene a livello di Asp1, oppure un frammento solubile extracellulare

chiamato sAPP β ' ed un frammento carbossi-terminale di 89 aa chiamato C89, quando il taglio avviene a livello di Glu11 (Naslund, Schierhorn et al. 1994, Lee, Zhang et al. 2005, Cole and Vassar 2007). Così come sAPP α , anche sAPP β viene processata dalla γ -secretasi, con il conseguente rilascio del dominio intracellulare AICD e del peptide A β nel reticolo endoplasmatico, nel trans-Golgi e nei sistemi endo-lisosomiali. Sono quindi necessari due tagli consecutivi affinché venga prodotta A β , successivamente secreta nello spazio extracellulare mediante esocitosi.

La via non amiloidogenica è particolarmente attiva sulla membrana plasmatica (Parvathy, Hussain et al. 1999, Wang, Shan et al. 2013), dove l' α -secretasi è ancorata; al contrario, la via amiloidogenica prevale a livello di comparti endo/lisosomiali, dove l'ambiente acido favorisce l'attività di BACE (Daugherty and Green 2001, Das, Scott et al. 2013).

Per molti anni si è pensato che il taglio operato dalla α -secretasi avesse un ruolo neuroprotettivo, al contrario di quello amiloidogenico operato da BACE (Zhang, Thompson et al. 2011). Tuttavia, oggi sappiamo che il taglio ad opera di β - e γ -secretasi, rispettivamente all'estremità N- e C-terminale di A β , avviene in condizioni fisiologiche, suggerendo che tutti i frammenti di APP, amiloide compresa, abbiano un significato fisiologico (Haass, Schlossmacher et al. 1992, Seubert, Vigo-Pelfrey et al. 1992).

A β esiste come monomero, dimeri ed oligomeri, dalla cui aggregazione si formano protofibrille e fibrille, le quali sembrano comporre la maggior parte delle placche senili nei cervelli AD (Walsh, Hartley et al. 1999, Walsh, Tseng et al. 2000).

Sulla base del suo sito di taglio, la β -secretasi è in grado di generare diverse forme di A β , che comprendono tra i 38 e i 43 amminoacidi. Tra queste, A β_{40} è quella più abbondante nei soggetti sani e nei pazienti AD; tuttavia, sebbene presente in quantità inferiori, A β_{42} ha suscitato un

maggior interesse per via della sua tendenza ad aggregare, formando oligomeri con potenziale attività neurotossica.

Il ruolo di A β nell'AD

Come accade in altre malattie neurodegenerative, l'AD è quindi caratterizzata dalla formazione e dall'accumulo cerebrale di aggregati proteici che formano depositi fibrillari altamente stabili e insolubili (Glennner and Wong 1984). Tra questi, le placche neuritiche hanno ricevuto grande attenzione per molti anni, essendo ritenute responsabili della disfunzione sinaptica, della perdita di memoria e, soprattutto, del danno strutturale cerebrale.

Questi studi hanno così contribuito alla formulazione dell'ipotesi amiloidogenica, la quale sostiene che l'overproduzione di A β e la sua conseguente aggregazione nelle placche senili siano la causa principale della malattia (Hardy and Allsop 1991). In accordo con tale ipotesi, A β sarebbe responsabile di una cascata di eventi che conducono a morte neuronale, disfunzione sinaptica e concomitante risposta infiammatoria (Hardy and Higgins 1992). Negli anni, questa ipotesi è stata avvalorata dalle seguenti evidenze, recentemente revisionate da Selkoe et al. in (Selkoe and Hardy 2016):

- tutti i pazienti AD presentano una progressiva deposizione di A β seguita da citopatia neuritaria e gliale a livello di quelle regioni del cervello che sottostanno alla memoria e alla conoscenza;
- gli aggregati di A β esercitano effetti citotossici in vitro e la tossicità è stata imputata alla specifica morfologia fibrillare;
- le mutazioni del gene di APP provocano forme aggressive di FAD. La maggior parte di queste si raggruppa a livello di quei siti di APP che subiscono il clivaggio da parte delle secretasi,

promuovendo in tal modo il processing di APP e, di conseguenza, la produzione e l'autoaggregazione di A β ;

- gli individui con trisomia 21 (sindrome di Down) presentano 3 copie del gene di APP e sviluppano invariabilmente la patologia di AD. Coloro che muoiono nella prima fase dell'adolescenza (per altre cause) mostrano abbondanti accumuli di A β . Tuttavia, non mostrano distrofia neuritica, microgliosi, astrocitosi e formazione di grovigli neurofibrillari, che maturano gradualmente nella tarda adolescenza e oltre;

- l'ereditarietà di una mutazione di APP, che diminuisce la produzione e l'aggregazione di A β , previene l'AD e il declino cognitivo correlato all'età.

Le forme insolubili di A β , presenti nelle placche neuritiche e formate *in vitro* a partire dall'amiloide sintetica, hanno dominato lo scenario scientifico fino a quando un'importante scoperta, confermata da numerosi studi *in vitro* e *in vivo*, ha dimostrato che anche le forme solubili di A β sono presenti nel cervello (Wisniewski, Ghiso et al. 1994, Tamaoka, Sawamura et al. 1997).

Gli aggregati solubili di A β sono costituiti da monomeri, dimeri ed oligomeri. Studi pre-clinici hanno confermato che dimeri, trimeri, tetrameri, dodecameri e oligomeri ad alto peso molecolare sono tutti in grado di indurre effetti neurotossici e di compromettere rapidamente la plasticità sinaptica, con particolare riferimento alla Long Term Potentiation (LTP), considerata il correlato elettrofisiologico della memoria (Walsh and Selkoe 2007) (vedi paragrafo 3.1.1).

Queste evidenze hanno suffragato una più recente "ipotesi degli oligomeri" (Ferreira and Klein 2011, Ripoli, Piacentini et al. 2013), secondo la quale gli oligomeri di A β , ma non i monomeri o le fibrille, sarebbero responsabili della disfunzione sinaptica e della perdita di memoria nell'AD

(Attar, Ripoli et al. 2012, Ripoli, Piacentini et al. 2013). Ciò ha stimolato la ricerca di nuove terapie mirate a bersagliare specificamente gli oligomeri di A β , nonostante il fallimento dei trials clinici volti a ridurre i livelli di A β (Doody, Thomas et al. 2014, Karran and Hardy 2014).

In effetti, sebbene la sperimentazione nei modelli animali di AD abbia fornito risultati promettenti, gli studi clinici sui farmaci anti-A β non hanno ancora mostrato alcuna efficacia nel contrastare la patologia umana. Tra questi farmaci ricordiamo gli anticorpi monoclonali bapineuzumab, solanezumab, crenezumab e gantenerumab; gli inibitori della γ -secretasi, flurizan e semagacestat; gli anti A β -aggreganti, alzhemed e tramiprosate.

Nonostante i trenta anni di ricerca per definire il ruolo di A β nella neurotossicità e nell'AD (Selkoe 1994, Howlett, Jennings et al. 1995, Iversen, Mortishire-Smith et al. 1995, Forloni 1996, Mattson 1997), nessuno è riuscito ancora a chiarire se l'accumulo di amiloide rappresenti una causa oppure un effetto della malattia. Inoltre, le evidenze contrarie all'ipotesi amiloidogenica sono molteplici ed in continuo aumento (Herrup 2015, Ricciarelli and Fedele 2017).

Innanzitutto, l'AD ad insorgenza tardiva, che rappresenta il 95% dei casi di AD, non è collegata ad anomalie genetiche che portano a un'iperproduzione di A β , come nella forma familiare, sebbene il fenotipo possa essere comparabile. In secondo luogo, è noto dagli anni '90 che non esiste alcuna correlazione tra la deposizione di A β e il grado clinico di demenza tra i soggetti affetti da AD (Terry, Masliah et al. 1991, Arriagada, Growdon et al. 1992, Dickson, Crystal et al. 1995, Sloane, Pietropaolo et al. 1997); infatti, si possono trovare placche nel cervello di individui senza alcun segno di demenza (Katzman, Terry et al. 1988, Delaere, Duyckaerts et al. 1990, Dickson, Crystal et al. 1995). In terzo luogo, studi recenti suggeriscono che la formazione delle placche potrebbe avere un ruolo neuroprotettivo, finalizzato a ridurre i livelli di A β solubile (Cheng, Scarce-Levie et al. 2007, Reitz 2012).

Numerosi lavori presenti in letteratura dimostrano che A β esercita un ruolo fisiologico nel sistema nervoso centrale (SNC) necessario alla crescita neuronale, al rilascio di neurotrasmettitori, alla funzione sinaptica e alla formazione della memoria (Puzzo and Arancio 2013, Puzzo, Gulisano et al. 2015). A sostegno di ciò, ad esempio, il laboratorio del Prof. Ottavio Arancio e altri laboratori hanno dimostrato che: 1) la somministrazione di basse concentrazioni di A β oligomerica modula positivamente le funzioni sinaptiche (Puzzo, Privitera et al. 2008, Morley, Farr et al. 2010, Lawrence, Tong et al. 2014); 2) il blocco di A β endogena provoca la compromissione della plasticità sinaptica e della memoria nei cervelli sani (Garcia-Osta and Alberini 2009, Morley, Farr et al. 2010, Puzzo, Privitera et al. 2011, Lawrence, Tong et al. 2014).

Meccanismi molecolari della memoria

Memoria e apprendimento

Apprendimento e memoria sono le principali funzioni cerebrali che permettono ad un individuo di adattarsi all'ambiente che lo circonda, costruire una propria storia personale e acquisire la consapevolezza di sé.

La memoria a lungo termine si suddivide in memoria esplicita, o memoria dichiarativa, e memoria implicita, o memoria procedurale.

La memoria dichiarativa, sottende all'apprendimento di fatti ed esperienze ed è una forma di conoscenza flessibile, che può essere richiamata consciamente ed essere riferita verbalmente.

La memoria procedurale, invece, si riferisce tipicamente all'apprendimento di riflessi motori o percettivi e richiede l'attivazione delle aree del cervello che governano sistemi motori e sensoriali specifici.

Gli studi volti alla comprensione dei meccanismi molecolari della memoria dichiarativa sono stati condotti soprattutto sui roditori (topi e ratti), che mostrano caratteristiche corticali simili a quelle del cervello umano (presenza dei lobi temporali e della corteccia cerebrale, incluso l'ippocampo).

A partire dagli anni '50, studi su pazienti che hanno subito la rimozione bilaterale dell'ippocampo e delle regioni vicine ai lobi temporali, hanno evidenziato il diretto coinvolgimento di queste aree nei meccanismi di formazione della memoria. In particolare, la scoperta del ruolo fondamentale dell'ippocampo ha fortemente incentivato lo studio di questa struttura per l'identificazione dei meccanismi molecolari che sottostanno ai processi mnemonici.

L'ippocampo, il cui nome deriva dalla sua forma, che ricorda quella di un cavalluccio marino, è una parte del telencefalo localizzata all'interno del lobo temporale mediano. Esso forma parte del sistema limbico e gioca un ruolo determinante nella formazione della memoria e nell'orientamento spaziale.

Nell'AD l'ippocampo è una delle prime regioni cerebrali a subire danno, determinando deficit cognitivo e perdita di memoria.

L'ippocampo consta principalmente di due tipi di neuroni: i neuroni eccitatori glutamatergici e i neuroni inibitori GABAergici (che rilasciano acido γ -amminobutirrico). Nello specifico, gli assoni dei neuroni inibitori entrano in contatto con i neuroni vicini, sia inibitori sia eccitatori, e modulano localmente l'attività della rete neuronale, mentre gli assoni dei neuroni eccitatori raggiungono i neuroni più distanti, conducendo il segnale dalla struttura del cervello in cui hanno sede ad altre aree cerebrali. La regolazione dinamica di queste connessioni sinaptiche è denominata plasticità sinaptica, ed è ritenuta alla base del processo di formazione della memoria.

L'ippocampo forma una rete neuronale, composta da diversi tipi di cellule eccitatorie, piramidali o granulari, localizzate in tre distinte regioni: il giro dentato (DG, Dentate Gyrus) e le aree del corno di Ammone (CA1 e CA3, *Cornus Ammon*). Queste tre regioni cellulari sono connesse alle cellule granulari del DG attraverso i neuroni della corteccia entorinale, il più importante centro relay tra la corteccia e l'ippocampo. Gli assoni di questi neuroni comunicano con le cellule dei granuli, i cui assoni fanno sinapsi con i neuroni piramidali della regione CA3. Questi, a loro volta, proiettano verso i neuroni piramidali delle fibre collaterali, denominate fibre collaterali di Schaffer, che decorrono parallelamente alla regione CA1. Infine, gli assoni dei neuroni della regione CA1 forniscono il principale output dalla struttura dell'ippocampo verso la corteccia, passando nuovamente attraverso la corteccia entorinale (Bliss and Collingridge 1993).

La struttura laminare dell'ippocampo, nella quale i neuroni pre- e postsinaptici sono chiaramente distinguibili, ha rappresentato uno strumento ideale per lo studio dei meccanismi molecolari che risiedono alla base della plasticità sinaptica. In particolare, questa struttura mostra la forma di plasticità neuronale attività-dipendente meglio conosciuta, ossia il potenziamento a lungo termine (LTP, Long Term Potentiation) della forza sinaptica.

Long Term Potentiation (LTP)

I meccanismi molecolari della memoria consistono di una prima fase a breve termine, durante la quale si verificano rapide alterazioni locali di comunicazione neuronale causate dalla modificazione nella posizione e nella funzione di proteine sinaptiche preesistenti, e di una fase successiva a lungo termine, durante la quale avvengono modificazioni più sostanziali, come la crescita di nuove connessioni neuronali, attraverso una trascrizione genica *de novo*.

L'attività sinaptica cerebrale può essere misurata in vitro attraverso opportune tecniche elettrofisiologiche. Con il termine di LTP si indica generalmente il fenomeno con cui la corrente

sinaptica viene potenziata da uno stimolo elettrico applicato a fettine sottili di tessuto cerebrale. Lo stesso fenomeno si verifica, in vivo, durante i processi mnemonici.

Nello specifico, il tracciato elettrofisiologico raffigurante l'Early-LTP (E-LTP, Fig. 3A) mima l'andamento della corrente sinaptica durante l'elaborazione della memoria a breve termine, in cui il potenziamento decade entro 180 minuti dallo stimolo. Nella Late-LTP (L-LTP, Fig. 3B), invece, il potenziamento della corrente rimane elevato nel tempo, come durante l'elaborazione della memoria a lungo termine.

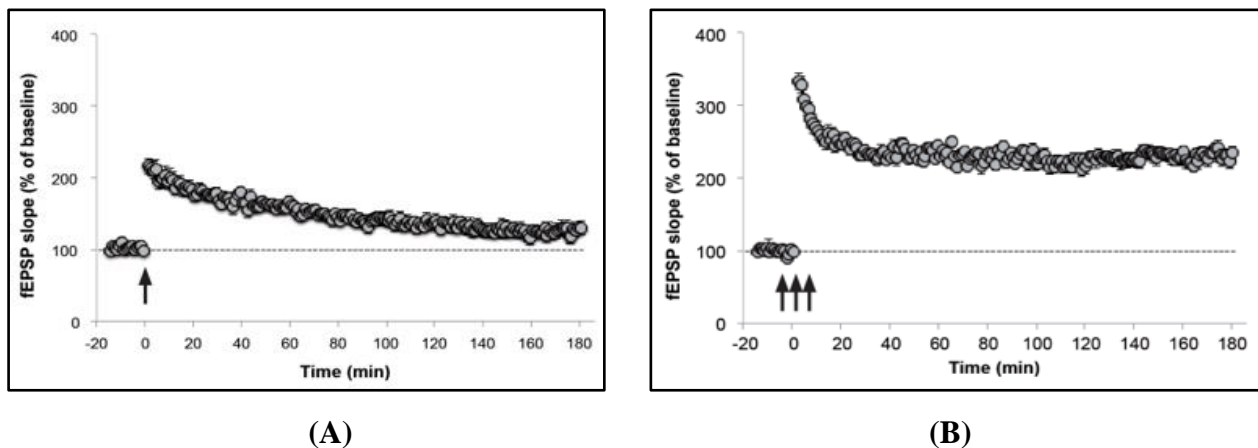


Fig. 3– Long Term Potentiation.

- (A) Early-LTP (E-LTP), fase transitoria che non dipende dalla trascrizione genica e dalla sintesi proteica.
(B) Late-LTP (L-LTP), dipendente dalla trascrizione di nuovi geni e dalla sintesi de novo di proteine.

È noto da tempo che questi due fenomeni richiedono la disponibilità di nucleotidi ciclici. In particolare, la E-LTP necessita di cGMP ed è indipendente dalla sintesi proteica, mentre la L-LTP richiede cAMP e necessita di sintesi proteica (Zhuo, Hu et al. 1994, Nguyen and Woo 2003).

Capitolo 1: Il ruolo del cGMP e di A β nei processi di formazione della memoria

1.1. Background molecolare

**Il ruolo del cGMP e di A β nei processi
di formazione della memoria**

1.1.1. Guanosina monofosfato ciclico (cGMP), fosfodiesterasi (PDE) e plasticità sinaptica

Negli ultimi anni, l'attenzione delle neuroscienze si è particolarmente focalizzata sul possibile ruolo delle molecole coinvolte nella trasmissione neuronale durante l'apprendimento e la memoria. La trasmissione nitrgica, ad esempio, ha ricevuto un notevole interesse per la peculiare funzione dell'ossido nitrico (NO) come messaggero retrogrado e per il coinvolgimento della via NO/cGMP nella plasticità sinaptica e nella memoria (Lu, Kandel et al. 1999).

L'NO è una molecola gassosa in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana plasmatica e viene sintetizzata mediante la conversione dell'amminoacido L-arginina in L-citrullina dall'enzima NO sintasi (NOS).

Una volta formato, l'NO diffonde attraverso la membrana cellulare per gradiente di concentrazione e si combina con il suo recettore biologico, la guanilato ciclastasi solubile (sGC) che, a sua volta, sintetizza la guanosina monofosfato ciclico (cGMP), convertendo la guanosina 5'-trifosfato (GTP) in cGMP.

Il cGMP è un nucleotide ciclico. Questa nomenclatura deriva dal fatto che il gruppo fosfato è legato a due gruppi idrossilici di uno zucchero, che ciclizzano formando un anello. Esso funziona come secondo messaggero, trasmettendo ed amplificando i segnali in entrata dei recettori presenti a livello della superficie cellulare e innescando una catena di reazioni in grado di evocare una risposta biologica. Poiché è un nucleotide idrofilo, trasmette il segnale all'interno del citosol, attivando principalmente protein chinasi e canali ionici. In particolare, esso attiva la sua proteina chinasi dipendente, la PKG, che va a fosforilare proteine target specifiche.

Negli ultimi decenni lo studio di questa via di segnalazione ha rivelato una notevole complessità (Francis, Blount et al. 2011). Infatti, gli effetti del cGMP non dipendono solo dalla concentrazione, ma anche le componenti temporali e spaziali rivestono un ruolo di notevole

importanza. I segnali possono variare in termini di tempo, da millisecondi a ore, e spesso mostrano una determinata compartimentalizzazione in una parte specifica della cellula.

Il cGMP è essenziale nella segnalazione di numerose funzioni cellulari, tra cui il rilascio di neurotrasmettitori, la neuroprotezione e la neuroplasticità (Francis, Blount et al. 2011). Inoltre, il pathway cGMP/PKG sembra svolgere un ruolo chiave nella plasticità sinaptica e nella memoria; infatti, farmaci in grado di aumentare i livelli di cGMP o di attivare la PKG migliorano la LTP e la memoria, mentre l'inibizione di questa via blocca la plasticità sinaptica e i processi cognitivi (Thatcher, Bennett et al. 2005). L'attivazione della PKG, a sua volta, porta alla fosforilazione della proteina CREB, un fattore di trascrizione che si lega a specifiche sequenze del DNA, dette elementi di risposta al cAMP (CRE), modulando la trascrizione di geni implicati nei processi di apprendimento e memoria. Per questo motivo, la fosforilazione di CREB rappresenta un evento critico nella LTP e nei processi di formazione della memoria a lungo termine (Lu, Kandel et al. 1999, Lu and Hawkins 2002).

Diversi farmaci che agiscono sulla via NO/cGMP sono stati proposti per il trattamento dell'AD e di altre patologie caratterizzate da compromissione della memoria. Tuttavia, i nitrati (come la nitroglicerina), classicamente usati per il trattamento dell'angina pectoris, non risultano idonei a causa degli effetti periferici sul sistema cardiovascolare. La sperimentazione clinica si è quindi concentrata sui farmaci in grado di bloccare la degradazione del cGMP: gli inibitori delle fosfodiesterasi.

Le fosfodiesterasi (PDE) sono una classe di enzimi deputati alla rottura dei legami fosfodiesterici e svolgono un ruolo importante nella trasduzione del segnale, poiché degradano i nucleotidi ciclici cAMP e cGMP, una volta terminata la risposta biologica. Gli inibitori delle PDE (PDE-Is),

riducendo la degradazione di cAMP e/o cGMP (Beavo 1995), producono l'aumento di una o di entrambe le molecole.

Sono state identificate nell'uomo oltre 100 PDE, suddivise in 11 famiglie che differiscono per la loro distribuzione e per la specificità di substrato (Bender and Beavo 2006). PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11 hanno una duplice specificità di substrato, sono infatti in grado di idrolizzare sia il cAMP che il cGMP; PDE4, PDE7 e PDE8 sono specifiche per il cAMP; PDE5, PDE6 e PDE9 sono specifiche per il cGMP.

Ad oggi, le PDE sono state testate come possibili bersagli farmacologici nella terapia del dolore (PDE4, PDE5), della perdita di memoria (PDE2, PDE4, PDE5, PDE9), dell'AD (PDE4, PDE5), della depressione (PDE4), della schizofrenia (PDE10), e dell'ictus (PDE3, PDE5).

Numerosi studi hanno dimostrato che l'inibizione selettiva della PDE4D, enzima che idrolizza specificamente il cAMP, potrebbe giovare nel trattamento del deficit cognitivo tipico di diverse patologie neurologiche, tra cui l'AD (Bruno, Fedele et al. 2011, Ricciarelli, Puzzo et al. 2014, Ricciarelli and Fedele 2015, Ricciarelli, Brullo et al. 2017).

Per quanto riguarda le PDE5, lo sviluppo di PDE5-Is selettivi, come sildenafil, vardenafil e tadalafil, era inizialmente mirato a trattare i disturbi erettili (Setter, Iltz et al. 2005); tuttavia, studi più recenti hanno dimostrato che l'inibizione selettiva della PDE5 induce il potenziamento dei processi cognitivi.

Nei roditori, il primo PDE5-Is ad essere testato è stato lo zaprinast. Il trattamento acuto con zaprinast ha indotto un miglioramento del consolidamento della memoria in ratti di 3 mesi (Domek-Lopacinska and Strosznajder 2008). Sebbene il farmaco sia in grado di inibire debolmente anche le PDE1, PDE9, PDE10 e PDE11, si ritiene che alle basse concentrazioni

utilizzate in questo studio abbia agito selettivamente sulla PDE5 (Domek-Lopacinska and Strosznajder 2008).

Puzzo et al. (Puzzo, Staniszewski et al. 2009, Puzzo, Loreto et al. 2014), sono stati i primi a dimostrare che la somministrazione cronica di sildenafil migliora la plasticità sinaptica e la memoria nei topi APP/PS1. Questo effetto è stato associato all'aumento della fosforilazione di CREB, alla riduzione di proteine proapoptotiche e all'aumento di quelle antiapoptotiche, alla riduzione dei livelli di A β e, infine, all'aumento di molecole collegate alla neuroplasticità (Puzzo, Loreto et al. 2014).

Nei ratti, il sildenafil migliora il consolidamento della memoria alla dose di 3 mg/kg (Prickaerts, van Staveren et al. 2002), mentre nei topi la dose di picco in grado di indurre effetti simili è di 1 mg/kg (Rutten, Vente et al. 2005), evidenziando possibili differenze farmacocinetiche nelle diverse specie.

Infine, il trattamento cronico con sildenafil ha migliorato i deficit cognitivi e la patologia associata a tau in un modello sperimentale d'invecchiamento accelerato (mouse-accelerated mouse prono-8: SAMP8) (Orejana, Barros-Minones et al. 2012).

1.2. Scopo della ricerca

**Il ruolo del cGMP e di A β nei processi
di formazione della memoria**

La malattia di Alzheimer (AD) è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da deterioramento cognitivo con iniziale perdita di memoria che arriva fino al quadro conclamato di demenza. Come ampiamente descritto nella parte introduttiva, la patologia è associata alla presenza di placche cerebrali costituite da depositi di beta-amiloide ($A\beta$), un peptide derivante dalla proteolisi del suo precursore APP (Amyloid Precursor Protein), una glicoproteina transmembrana particolarmente espressa nei neuroni.

Per molti anni l'accumulo di $A\beta$ è stato considerato la causa e il marker principale dell'AD, in accordo a quella che viene chiamata "ipotesi amiloidogenica", secondo la quale l'eccessiva produzione di $A\beta$ scatenerrebbe una serie di eventi che causano disfunzione sinaptica, deficit cognitivo e atrofia cerebrale (Selkoe and Hardy 2016).

Tuttavia, numerose evidenze suggeriscono che $A\beta$ svolga una funzione fisiologica nel sistema nervoso centrale (Pearson and Peers 2006, Gulisano, Maugeri et al. 2018). Infatti, è stato dimostrato che $A\beta$ si accumula anche nei cervelli di pazienti cognitivamente sani (Tamaoka, Sawamura et al. 1997) e nelle cellule in coltura (Haass, Schlossmacher et al. 1992). Inoltre, concentrazioni picomolari di questo peptide modulano positivamente la plasticità sinaptica e la LTP (Bernabeu, Schmitz et al. 1996, Son, Lu et al. 1998, Lu, Kandel et al. 1999, Rutten, Prickaerts et al. 2007, Rutten, Basile et al. 2008, Bollen, Puzzo et al. 2014, Matsumoto, Sandoz et al. 2014).

E' noto da tempo come i nucleotidi cAMP e cGMP, due importanti "secondi messaggeri" coinvolti nei meccanismi di trasduzione del segnale all'interno delle cellule, giochino un ruolo fondamentale nell'LTP, e quindi nella memoria, essendo coinvolti sia nell'induzione che nel mantenimento di tale processo (Bernabeu, Schmitz et al. 1996, Son, Lu et al. 1998, Lu, Kandel et al. 1999, Rutten, Prickaerts et al. 2007, Rutten, Basile et al. 2008, Bollen, Puzzo et al. 2014,

Matsumoto, Sandoz et al. 2014). In particolare, la Late-LTP (L-LTP) sembra essere sostenuta dalla formazione intracellulare di cAMP, mentre la Early-LTP (E-LTP) richiede la disponibilità di cGMP (Zhuo, Hu et al. 1994, Nguyen and Woo 2003). Inoltre, diversi tipi di test comportamentali indicano chiaramente che l'incremento dei livelli di cAMP e cGMP favorisce l'LTP ippocampale e migliora la performance cognitiva (Reneerkens, Rutten et al. 2009, Bruno, Fedele et al. 2011).

Sulla base di queste evidenze, numerosi studi si sono focalizzati sul potenziale utilizzo degli inibitori delle fosfodiesterasi (PDE-Is) nella terapia della malattia di Alzheimer. Questi farmaci, infatti, aumentano la concentrazione di cAMP e cGMP perchè inibiscono gli enzimi, PDE appunto, deputati alla loro degradazione.

Gli studi condotti negli ultimi anni nel laboratorio in cui lavoro hanno dimostrato che l'aumento del cAMP, indotto dall'inibizione della PDE4, sostiene la L-LTP e migliora la memoria, e che questo meccanismo richiede la sintesi del precursore di A β (APP) e la conseguente produzione di amiloide (Canepa, Domenicotti et al. 2013, Ricciarelli, Puzzo et al. 2014).

A fronte di questi risultati, lo scopo del lavoro qui proposto è stato quello di verificare se A β fosse coinvolta anche nel processo cGMP-dipendente della E-LTP, investigando possibili meccanismi di correlazione tra cGMP e A β , nel tentativo di rivelare un nuovo pathway molecolare implicato nei processi di formazione della memoria.

1.3. Materiali e metodi

**Il ruolo del cGMP e di A β nei processi
di formazione della memoria**

1.3.1. Colture cellulari e trattamenti

Le cellule di neuroblastoma murino (N2a) sono cresciute in terreno contenente: 50% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50% opti-MEM (Life Technologies, Carlsbad, CA), 0.1 mM amminoacidi non essenziali (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1% glutammina (Euroclone, Milano, IT), 1% penicillina/streptomicina (Euroclone, Milano, IT) e 5% siero fetale bovino (FBS, Euroclone, Milano, IT). Vardenafil (100 mM in dimetil-solfossido, DMSO) e Sildenafil (100 mM in DMSO) sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). ODQ (100 mM in DMSO) è stato acquistato da Tocris Bioscience (Bristol, UK). L'inibitore II della β -secretasi è stato ottenuto da Merck Millipore (Darmstadt, Germany) e quello della γ -secretasi (Compound E) da Adipogen (Liestal, Switzerland).

Tali sostanze sono state conservate a -20°C e, immediatamente prima dell'uso, diluite per raggiungere le concentrazioni desiderate. I diluenti utilizzati sono: terreno di coltura (per le cellule N2a), Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF, con la seguente composizione: 124 mM di NaCl, 4.4 mM di KCl, 1 mM di Na_2HPO_4 , 25 mM Na_2HCO_3 , 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2) per le fettine di ippocampo. Le concentrazioni finali sono state scelte sulla base degli studi condotti in precedenza (Prickaerts, van Staveren et al. 2002, Bollen, Puzzo et al. 2014).

Per gli esperimenti di elettrofisiologia è stata usata $\text{A}\beta_{1-42}$ sintetica (American Peptide, California, USA), preparata come descritto in letteratura (Puzzo et al., 2008). Il peptide liofilizzato è stato risospeso in 100% 1,1,1,3,3,3-esfluoro-2-propanolo (HFIP) (Sigma-Aldrich, St. Louis) alla concentrazione di 1 mM. Successivamente, tale solvente è stato evaporato per ottenere un film di $\text{A}\beta$ che può essere conservato a -20°C per lunghi periodi. Il film è stato poi disciolto in DMSO, sonicato per 10 minuti, aliquotato ed infine riposto nuovamente a -20°C . Prima dell'utilizzo, per permettere l'oligomerizzazione di $\text{A}\beta_{1-42}$, un'aliquota è stata diluita alla concentrazione

desiderata in ACSF e incubata a 4°C per 24 ore. Come dimostrato in studi precedenti (Puzzo, Privitera et al. 2008, Puzzo, Privitera et al. 2011, Puzzo, Privitera et al. 2012), questa preparazione sintetica di A β ₄₂ contiene oligomeri e monomeri in proporzioni simili a quelle riscontrabili nell'ambiente cerebrale fisiologico. La concentrazione di A β ₁₋₄₂ è stata calcolata sulla base del peso molecolare del suo monomero. Un peptide sintetico con la stessa composizione aminoacidica, ma diversa sequenza (scramble A β ₁₋₄₂; AnaSpec, Fremont, CA) è stato usato come controllo negativo (Puzzo, Privitera et al. 2008).

1.3.2. Modelli animali

Per gli esperimenti inclusi in questa tesi, sono stati usati due modelli di topo di 3-4 mesi di età: topi C57BL/6J wild-type (WT), utilizzati come controlli, e topi B6.129S7-Ap^{tm1Dbo}/J in cui è stata soppressa l'espressione del gene per APP (APP KO). Questi animali sono stati allevati nello stabulario del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche dell'Università di Catania. Inoltre, sono stati usati ratti Sprague-Dawley adulti ottenuti da una colonia allevata nello stabulario del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Genova.

Tutti gli animali sono stati mantenuti a temperatura (22 ± 1°C) ed umidità relativa (50%) costanti, con cicli regolari di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Cibo e acqua erano liberamente disponibili.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in conformità con la Direttiva del Consiglio della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/CEE). Ogni sforzo è stato applicato per ridurre al minimo la sofferenza ed il numero di animali utilizzati.

1.3.3. Preparazione delle sezioni di ippocampo

Le fettine di ippocampo di ratto Sprague-Dawley sono state preparate tagliando sezioni trasversali sottili di tessuto (250 μm) con un chopper McIlwain. I campioni sono stati preparati in collaborazione con il Prof. Ernesto Fedele, presso il Dipartimento di Farmacia, sezione di Farmacologia e Tossicologia, dell'Università di Genova.

Le fettine di ippocampo di topo utilizzate negli esperimenti di elettrofisiologia sono state preparate tagliando sezioni trasversali di tessuto dello spessore di 400 μm . Gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati effettuati dal gruppo di ricerca della Prof. Daniela Puzzo, presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, sezione di Fisiologia, dell'Università di Catania.

1.3.4. Test ELISA per $A\beta$

I livelli di $A\beta_{1-42}$ secreti dalle cellule neuronali e dalle fettine di ippocampo nei rispettivi terreni di coltura sono stati quantificati in ELISA (Wako Chemicals GmbH, D). Le cellule N2a sono state trattate per 1 o 5 h come indicato nelle figure. Le fettine di ippocampo sono state incubate per 1 ora a 37°C in 2 ml di una soluzione fisiologica continuamente areata (con 95% di O_2 e 5% di CO_2) in presenza di un inibitore PDE5, come indicato nelle figure. Al termine delle incubazioni, i terreni condizionati sono stati raccolti, centrifugati a 1000 x g per 10 minuti (a 4°C) e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi in ELISA.

Le piastre ELISA da noi utilizzate sono rivestite con l'anticorpo monoclonale BNT77, che riconosce la sequenza 11-28 di $A\beta$. Una volta legata all'anticorpo primario, l'amiloide 1-42 è selezionata in base alla sua porzione C-terminale da un anticorpo secondario (BC05) legato alla perossidasi di rafano (HRP). L'attività enzimatica viene rilevata in seguito all'aggiunta di una

soluzione di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), substrato specifico della perossidasi. Sotto l'azione enzimatica, il substrato sviluppa una reazione colorimetrica assumendo una colorazione blu. Tale reazione viene bloccata con l'aggiunta di una soluzione di acido solforico, che vira la colorazione dal blu al giallo. La colorazione è proporzionale alla concentrazione del complesso antigene-anticorpo ($A\beta_{1-42}$ -BC05) ed è misurata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 450 nm. I livelli di $A\beta_{1-42}$ sono stati quantificati mediante l'interpolazione dei valori ottenuti nella curva standard preparata sulla stessa piastra.

1.3.5. Preparazione degli estratti proteici

Le cellule N2a sono state lisate in tampone contenente: 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), 1% inibitori di proteasi (Complete Mini, Roche S.p.A., Milano, IT) e 1% sodio-dodecilsolfato (SDS). I lisati cellulari sono stati centrifugati a 15000 x g per 10 minuti a 4°C ed i sopranatanti, corrispondenti agli estratti proteici totali, sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi in immunoblot. Le fettine di ippocampo sono state omogeneizzate in 0.6 ml di tampone freddo (0.5 mM EGTA, 25 mM NaF, 1 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Triton X-100, 1% inibitori di proteasi, 1 mM PMSF, 1% SDS) e quindi centrifugate a 10000 x g per 10 minuti a 4°C. I sovranatanti, dopo ulteriore analogia centrifugazione, sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi in immunoblot.

1.3.6. SDS-PAGE ed immunoblot

Per ogni campione analizzato sono stati utilizzati tra i 20 e i 50 µg di proteine totali, il cui dosaggio è stato effettuato secondo il metodo BCA (acido bicinconinico). Tale metodo è di tipo

colorimetrico e si basa sulla riduzione del Cu^{2+} a Cu^{1+} ad opera delle proteine in ambiente alcalino. Il colore viola del prodotto di reazione deriva dall'interazione di 2 molecole di BCA con uno ione rameoso; questo complesso, solubile in acqua, mostra una forte assorbanza alla lunghezza d'onda di 562 nm e permette la quantificazione spettrofotometrica delle proteine in soluzione acquosa.

Le proteine sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE), in presenza di SDS (SDS-PAGE). E' stato utilizzato il sistema Bio-Rad Mini-gels con gel precast (10 x 7.5 x 0.1 cm, 10% poliacrilamide) e si è seguito il metodo di Laemmli (Laemmli 1970). La corsa elettroforetica è stata effettuata a 140 volt, preceduta da una breve pre-corsa a 70 volt. Al termine della corsa, le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana di fluoruro di polivinilidene (PVDF) secondo il metodo di Towbin (Towbin, Staehelin et al. 1979), che prevede il trasferimento in un buffer freddo contenente 25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% metanolo. Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di PVDF avviene applicando una corrente di 100 volt per 60 minuti. La membrana viene quindi incubata in TBS tween (t/TBS: 200 mM Tris, 1.3 M NaCl, pH 7.5, 0.05% tween 20) contenente latte in polvere al 5%, allo scopo di saturare i possibili siti aspecifici di legame per l'anticorpo di interesse.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-APP umana (22C11, 1 µg/ml; Millipore Bioscience Research Agents, Burlington, MA), anti-β actina (clone AC-15, 1:10000; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), anti-PKG1 (Cell Signaling, Danvers, MA), anti-PKG2 (Genscript, Piscataway Township, NJ). Al termine delle incubazioni con l'anticorpo primario, le membrane sono state lavate in t/TBS e incubate con un anticorpo secondario (anti-mouse o anti-rabbit) diretto contro l'anticorpo primario e coniugato ad una perossidasi di rafano (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK). Le proteine sono state rilevate in chemiluminescenza, usando il kit ECL

(GE-Healthcare) ed esponendo le membrane a lastre fotografiche Hyperfilm ECL™. La quantificazione del segnale è stata eseguita attraverso analisi densitometrica delle bande sulle lastre fotografiche (software Quantity One 42.0, Biorad, Hercules, CA).

1.3.7. Valutazione dell'attività enzimatica della γ -secretasi (Exo-cell assay)

Il saggio Exo-cell per valutare l'attività della γ -secretasi è stato eseguito seguendo il protocollo di Shelton et al. (Shelton, Tian et al. 2009) con minime modifiche.

Le cellule N2a, seminate su piastre da 96 pozzetti, sono state pre-trattate con un inibitore della γ -secretasi (Compound E, 1 μ M) per 6 ore. Il medium di coltura è stato quindi sostituito con terreno fresco contenente 0,25% CHAPSO e 1 μ M Sb₄ (substrato specifico della γ -secretasi ottenuto da Yue-Ming Li, Cornell University, New York, NY), in presenza di 100 μ M VDF o DMSO. Il substrato Sb₄ contiene la sequenza aminoacidica 620–695 di APP695, legata alla biotina all'estremità N-terminale. La sequenza di APP presente nel peptide Sb₄ viene riconosciuta e clivata dalla γ -secretasi, con la conseguente produzione di A β ₄₀. Dopo 2 ore e mezza di trattamento, i terreni sono stati raccolti e centrifugati per 1 min a 14,000 x g. I sopranatanti (100 μ l per ogni campione) sono stati caricati su piastre rivestite di streptavidina e incubati per 2 ore, in agitazione, a temperatura ambiente. L'attività della γ -secretasi, direttamente proporzionale alla quantità di substrato clivato, è stata misurata in ELISA, in accordo con il protocollo del kit ELISA per A β ₄₀ (Wako).

1.3.8. Valutazione dell'attività enzimatica di BACE

L'attività di BACE nelle cellule N2a è stata valutata utilizzando una metodica di analisi fluorimetrica (BioVision, Milpitas, CA). Questo saggio si basa sul clivaggio specifico, operato da BACE, di un substrato esogeno coniugato alle molecole EDANS e DABCYL. Nella forma non clivata, la fluorescenza emessa da EDANS è schermata dalla vicinanza di DABCYL. Il clivaggio operato da BACE determina la separazione fisica delle due molecole, permettendo l'emissione del segnale fluorescente di EDANS.

Al termine dei trattamenti, le cellule N2a sono state processate per ottenere gli estratti proteici totali (come riportato precedentemente), ai quali è stato aggiunto il substrato di BACE. L'intensità di fluorescenza, direttamente proporzionale all'attività beta secretasica, è stata quantificata con l'impiego di un lettore di piastre fluorimetrico (eccitazione 355 nm/ emissione 510 nm).

1.3.9. Quantificazione del contenuto intracellulare di cGMP

Al termine delle incubazioni, le cellule sono state processate secondo le istruzioni fornite dal kit DetectX[®] Direct Cyclic GMP Enzyme Immunoassay (Arbor Assays). Si tratta di un saggio quantitativo che prevede l'utilizzo di un diluente acido che stabilizza il cGMP e inattiva le fosfodiesterasi endogene; fornisce inoltre uno standard di cGMP che permette di ottenere la curva di concentrazioni di riferimento. I campioni cellulari e gli standard vengono caricati in micropiastre i cui pozzetti sono rivestiti con un anticorpo (IgG) anti-topo. Successivamente, ad ogni pozzetto viene aggiunto del cGMP coniugato ad una perossidasi e un anticorpo monoclonale di topo anti-cGMP. Dopo un'incubazione di 2 ore a temperatura ambiente, si procede con il lavaggio delle piastre e l'aggiunta di un substrato che reagisce con la perossidasi

coniugata al cGMP producendo chemilumiscenza. L'intensità della reazione sviluppata, inversamente proporzionale alla concentrazione di cGMP endogeno, viene analizzata tramite lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 450 nm.

1.3.10. RNA interference

I duplex siRNA specifici per PKG1 e PKG2 murini (rispettivamente NM_001013833.3 e NM_008926.4), e il duplex siRNA di controllo, sono stati ottenuti da Dharmacon Inc. (Lafayette, USA). La transfezione è stata eseguita utilizzando 4 µl di DharmaFect® (Dharmacon Inc) per 100 nM di siRNA, in accordo con le istruzioni fornite dal produttore. L'efficienza del silenziamento è stata valutata mediante analisi in immunoblot.

1.3.11. Saggio di interazione tra APP e BACE

Questo saggio si avvale della tecnica dicomplementazione bimolecolare fluorescente (BiFC), che si basa sulla “ricostituzione” dei frammenti di una proteina fluorescente (nel nostro caso Venus) per la visualizzazione delle interazioni tra due proteine di interesse (Kerppola 2006). Abbiamo utilizzato due diversi costrutti: uno che esprime APP legata alla porzione N terminale di VENUS (VN), e uno che esprime BACE1 legata alla porzione C terminale della stessa proteina fluorescente (VC). I frammenti individuali VN e VC non sono di per sè fluorescenti, ma quando APP e BACE1 si avvicinano, la proteina VENUS si ricostituisce emettendo fluorescenza (Das, Wang et al. 2016).

Abbiamo utilizzato questa metodica in cellule N2a e neuroni ippocampali primari di topo co-transfettati transientemente con APP:VN e BACE1:VC. I neuroni primari hanno ricevuto anche il vettore di espressione di Lamp1-mCherry, utilizzato come marker delle vescicole

endo/lisosomiali. Dopo sei ore dalle transfezioni, eseguite utilizzando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, 2 μ l/ μ g DNA), le cellule sono state trattate con vardenafil o DMSO per ulteriori 16 ore e quindi fissate con una soluzione di paraformaldeide al 4%. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio invertito in epifluorescenza Olympus IX81. Le immagini di Z-stac sono state ottenute usando un obiettivo 100X (parametri di cattura: z-step 0.339 μ m, esposizione di 500 ms e binning 1 X 1).

Gli esperimenti di interazione tra APP e BACE nei neuroni primari sono stati condotti dal gruppo di ricerca del Prof. Subhojit Roy, presso il Dipartimento di Patologia e Neuroscienze dell'Università della California, San Diego.

1.3.12. Esperimenti di elettrofisiologia

Le registrazioni elettrofisiologiche sono state effettuate come descritto precedentemente (Bollen, Puzzo et al. 2014, Ricciarelli, Puzzo et al. 2014). Le fettine di ippocampo murino sono state trasferite in una camera di registrazione, mantenute a 29 °C (con 95% O₂ e 5% CO₂) e perfuse con ACSF ad una velocità di flusso di 2 ml/min. Le registrazioni sono state eseguite in seguito a stimolazione delle fibre collaterali di Schaeffer mediante l'utilizzo di un elettrodo bipolare al tungsteno. La risposta è stata rilevata a livello della regione CA1 dello stratum radiatum, con un capillare di vetro contenente ACSF. È stato registrato un segnale basale di 15 minuti ad un'intensità di stimolazione che evoca una risposta non superiore al 35% della risposta massima. Le risposte sono state registrate per 3 h dopo la tetanizzazione, misurate come "field EPSP (Excitatory Post Synaptic Potential) slope" ed espresse in percentuale rispetto al segnale basale. Questi esperimenti ,condotti su topi APP KO (B6.129S7-Apptm1Dbo/J) e WT (C57BL/6J), sono stati eseguiti in collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof. Daniela Puzzo, presso il

Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, sezione di Fisiologia, dell'Università di Catania.

1.3.13. Object recognition test (ORT)

L'ORT è un test comportamentale efficace per valutare l'apprendimento e la memoria nei topi (Bollen, Puzzo et al. 2014). Comprende un periodo di *ambientamento* di tre giorni, durante i quali gli animali vengono posti all'interno di un'arena di plastica (50 x 35 x 15 cm) contenente due oggetti diversi tra loro che vengono cambiati ogni giorno. Dopo 5 minuti di esplorazione, i topi ricevono un'iniezione intraperitoneale di soluzione salina e vengono nuovamente riposti nell'arena. Il quarto giorno, i topi vengono sottoposti al periodo di allenamento (T1), durante il quale l'arena contiene due oggetti identici tra loro. Dopo 3 minuti di esplorazione, gli animali vengono rimossi dall'arena e sottoposti all'iniezione intraperitoneale del farmaco da testare (nel nostro caso 1 mg/kg vardenafil, o un ugual volume di solvente). Dopo 24 ore, essi vengono nuovamente posti all'interno dell'arena per eseguire il test (T2), nel quale uno dei 2 oggetti è stato sostituito con uno diverso.

In condizioni normali e in assenza di trattamento, 24 ore di intervallo sono sufficienti affinché il topo dimentichi gli oggetti esplorati in precedenza e quindi non discrimini tra l'oggetto già visto e quello nuovo, impiegando quindi lo stesso tempo di esplorazione per entrambi.

In T2, il tempo di esplorazione, misurato come il tempo in cui il naso del topo è rivolto verso l'oggetto a una distanza inferiore ai 2 cm, viene valutato per analizzare: (1) il *tempo di esplorazione dell'oggetto familiare o dell'oggetto nuovo*, definito come “rapporto tra il tempo impiegato per esplorare ogni oggetto rispetto al tempo totale impiegato per esplorare entrambi gli oggetti” e viene espresso in percentuale; (2) *l'indice di discriminazione (D)*, calcolato come

“tempo di esplorazione dell’oggetto nuovo - tempo di esplorazione dell’oggetto familiare / tempo di esplorazione totale”; (3) *periodo di latenza*, definito come “tempo che intercorre tra il momento in cui il topo viene posto all’interno dell’arena e il primo approccio con il nuovo oggetto”; (4) *tempo di esplorazione totale*.

Per questo studio, l’ORT è stato condotto su topi APP KO (B6.129S7-Apptm1Dbo/J) e WT (C57BL/6J) dal gruppo di ricerca della Prof. Daniela Puzzo, presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, sezione di Fisiologia dell’Università di Catania.

1.3.14. Analisi Statistica

I risultati sono espressi come media \pm SEM (errore standard della media). L’analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software Systat. La distribuzione è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov ($p > 0.05$). Successivamente, in base al tipo di valutazione, abbiamo applicato il t-test di Student o l’ANOVA (a una e due vie), seguiti dal post-hoc test di Bonferroni o di Dunnett. La correlazione di Pearson è stata utilizzata per correlare i livelli di $A\beta_{42}$ e quelli di cGMP. Come limite di significatività statistica dei risultati è stato scelto $p < 0.05$.

1.4. Risultati

**Il ruolo del cGMP e di A β nei processi
di formazione della memoria**

1.4.1. L'aumento del cGMP determina l'incremento dei livelli di A β

Gli studi condotti negli ultimi anni nel laboratorio in cui lavoro hanno dimostrato che la L-LTP, sostenuta dal cAMP, richiede la sintesi del precursore di A β (APP) e la conseguente produzione di amiloide (Canepa, Domenicotti et al. 2013, Ricciarelli, Puzzo et al. 2014). Data l'implicazione del cGMP nella E-LTP, e considerato il ruolo dell'amiloide nel miglioramento della performance cognitiva e della plasticità sinaptica (Puzzo, Privitera et al. 2008, Puzzo, Privitera et al. 2011), abbiamo ipotizzato che anche la E-LTP potesse richiedere la disponibilità di A β .

Per testare tale ipotesi, abbiamo verificato che il cGMP fosse in grado di stimolare la produzione di A β_{1-42} in una linea cellulare di neuroblastoma murino (N2a). A tale scopo, abbiamo trattato le cellule N2a con due PDE5-Is, sildenafil e vardenafil (Shim, Pae et al. 2011), o con il solo solvente (DMSO), per un'ora. Abbiamo quindi misurato il contenuto intracellulare di cGMP mediante l'utilizzo di un saggio specifico (EIA), mentre il rilascio di A β_{1-42} nei terreni condizionati è stato valutato in ELISA. Come mostrato in Fig.1A, entrambi i PDE5-Is testati inducono un aumento dei livelli intracellulari di cGMP nelle cellule N2a. Inoltre, all'aumentare della concentrazione intracellulare di cGMP, aumenta in modo parallelo la produzione di A β_{1-42} . Infatti, il coefficiente di correlazione di Pearson calcolato tra i livelli di cGMP e quelli di A β_{1-42} è di 0.97, dato che dimostra la stretta correlazione tra i due eventi.

Ad ulteriore conferma, l'esperimento è stato condotto utilizzando un diverso modello sperimentale, ovvero le sezioni sottili di ippocampo, una regione cerebrale dotata delle caratteristiche di plasticità sinaptica necessarie all'apprendimento e alla memoria.

In Fig.1B è mostrato come il trattamento con sildenafil e vardenafil determini un aumento della concentrazione di A β_{1-42} anche nelle fettine di ippocampo, confermando i risultati ottenuti nelle cellule in coltura.

Questi dati dimostrano: a) che l'aumento del cGMP indotto dai PDE5-Is stimola la produzione di $A\beta_{1-42}$, e b) che tale effetto è maggiore nei campioni trattati con vardenafil, il quale è risultato più potente del sildenafil nell'aumentare i livelli di cGMP intracellulare.

Sulla base di ciò abbiamo tracciato una curva dose-risposta per definire la dose minima di vardenafil in grado di stimolare la secrezione di $A\beta_{1-42}$. Come mostrato in Fig. 1C, l'effetto esercitato dal vardenafil sull'amiloide risulta essere dose e tempo dipendente. Infatti, dopo un'ora di trattamento, vi è un significativo aumento dei livelli di $A\beta_{1-42}$ solo con vardenafil 100 μ M, mentre dopo 5 ore di esposizione si riscontrano differenze significative già alla concentrazione di 10 μ M.

I livelli intracellulari di cGMP dipendono dall'equilibrio che si instaura tra la sua produzione, da parte della guanilato ciclastasi (GC) e la sua degradazione, da parte delle PDEs. A tal proposito, per avvalorare la nostra ipotesi, abbiamo valutato l'effetto del vardenafil sulla secrezione di $A\beta_{1-42}$ nelle cellule trattate con un inibitore della GC, il [1H-[1,2,4]ossadiazolo-[4,3-a] chinossalin-1-one] (ODQ). Come riportato in Fig. 1D, inibendo la nuova sintesi di cGMP mediante il pretrattamento con ODQ, sildenafil e vardenafil producono un effetto limitato, corroborando il fatto che il cGMP sia implicato nella produzione di amiloide.

Abbiamo deciso di testare sildenafil e vardenafil nei principali esperimenti di biochimica e di elettrofisiologia. Negli esperimenti successivi, abbiamo testato solo il vardenafil, in quanto è risultato essere più potente del sildenafil nell'aumentare i livelli di cGMP intracellulare, e a sua volta di $A\beta$, e nel sostenere la LTP (capitolo 1.4.6.).

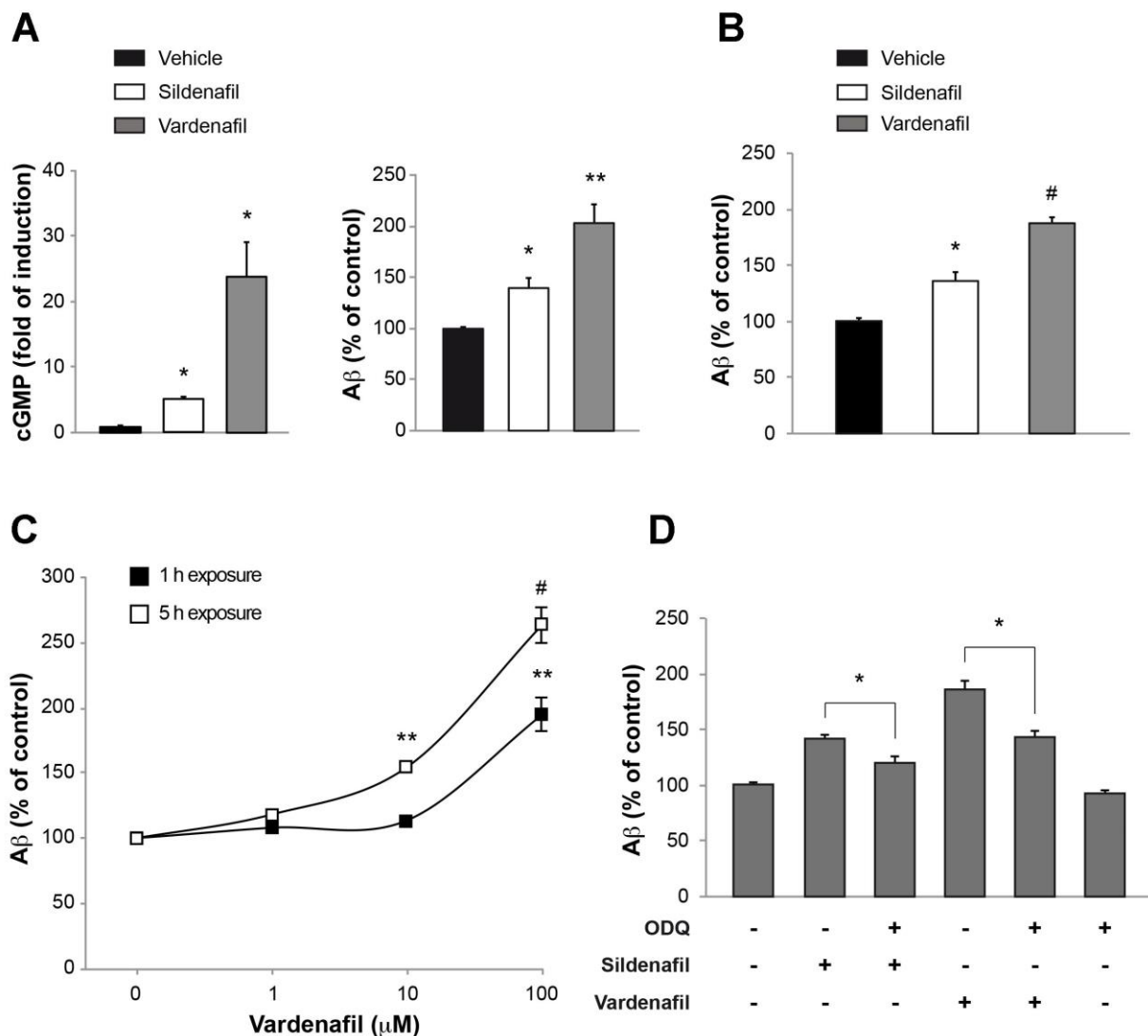


Fig. 1 – L'incremento del cGMP stimola la secrezione di Aβ

A, Vardenafil e sildenafil stimolano la secrezione di Aβ nelle cellule N2a. Il trattamento di un'ora con 100 μM di sildenafil o di vardenafil aumenta i livelli intracellulari di cGMP rispetto al trattamento con il veicolo (induzione del contenuto di cGMP: sildenafil = 5.17 ± 0.34 ; vardenafil = 23.36 ± 5.75 ; $p < 0.05$). L'analisi in ELISA di Aβ₄₂ nei terreni condizionati mostra che l'aumento dei livelli intracellulari di cGMP induce un aumento parallelo della secrezione di Aβ (livelli di Aβ in percentuale rispetto al controllo: sildenafil = $139 \pm 9.84\%$, $p < 0.05$; vardenafil = $202 \pm 17.92\%$ of control, $p < 0.005$). **B**, il trattamento con vardenafil e sildenafil aumenta i livelli di Aβ₄₂ nelle fettine d'ippocampo di ratto. In particolare, il sildenafil induce un aumento pari al $136 \pm 7.57\%$ del controllo e il vardenafil un aumento pari al $187.3 \pm 7.75\%$ del controllo. **C**, La curva dose-risposta rappresenta l'effetto di diverse concentrazioni di vardenafil sul rilascio di Aβ₄₂ dopo 1 ora (1 μM: $108.5 \pm 2.5\%$ del controllo; 10 μM: $113.5 \pm 0.5\%$ del controllo; 100 μM: $194.33 \pm 12.90\%$ del controllo) o 5 ore (1 μM: $118.33 \pm 3.17\%$ of control; 10 μM: $154.33 \pm 2.84\%$ del controllo; 100 μM: $262.66 \pm 13.86\%$ del controllo). **D**, L'inibitore della guanilato ciclastasi (ODQ) riduce la secrezione di Aβ indotta da sildenafil ($120.3 \pm 6.33\%$ vs 142.33 ± 2.40 del controllo) e vardenafil ($145.33 \pm 4.63\%$ vs 186.26 ± 7.28 del controllo), senza modificare i livelli basali di Aβ₄₂ ($93.9 \pm 3.59\%$ del controllo). I dati sono rappresentati come medie \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; # $p < 0.0001$.

1.4.2. Il cGMP non modifica l'espressione di APP

In questa parte dello studio abbiamo esaminato se il cGMP potesse incrementare l'espressione di APP, il precursore di A β . Abbiamo quindi trattato le cellule N2a con il vardenafil e abbiamo analizzato l'espressione di APP mediante immunoblot, utilizzando un anticorpo specifico che riconosce la sequenza N-terminale di APP (22C11). Abbiamo inoltre effettuato lo stesso esperimento anche in sezioni ippocampali di ratto mediante trattamento con sildenafil e vardenafil. Come mostrato in Fig 2, sia il sildenafil che il vardenafil (a differenti concentrazioni e tempi di esposizione), non modifica i livelli espressivi del precursore di A β in nessuna delle condizioni testate. Sulla base dei risultati ottenuti, possiamo quindi affermare che il cGMP stimola la produzione di amiloide senza aumentare l'espressione del suo precursore, in accordo con il fatto che la E-LTP indotta dal nucleotide ciclico non richiede sintesi proteica.

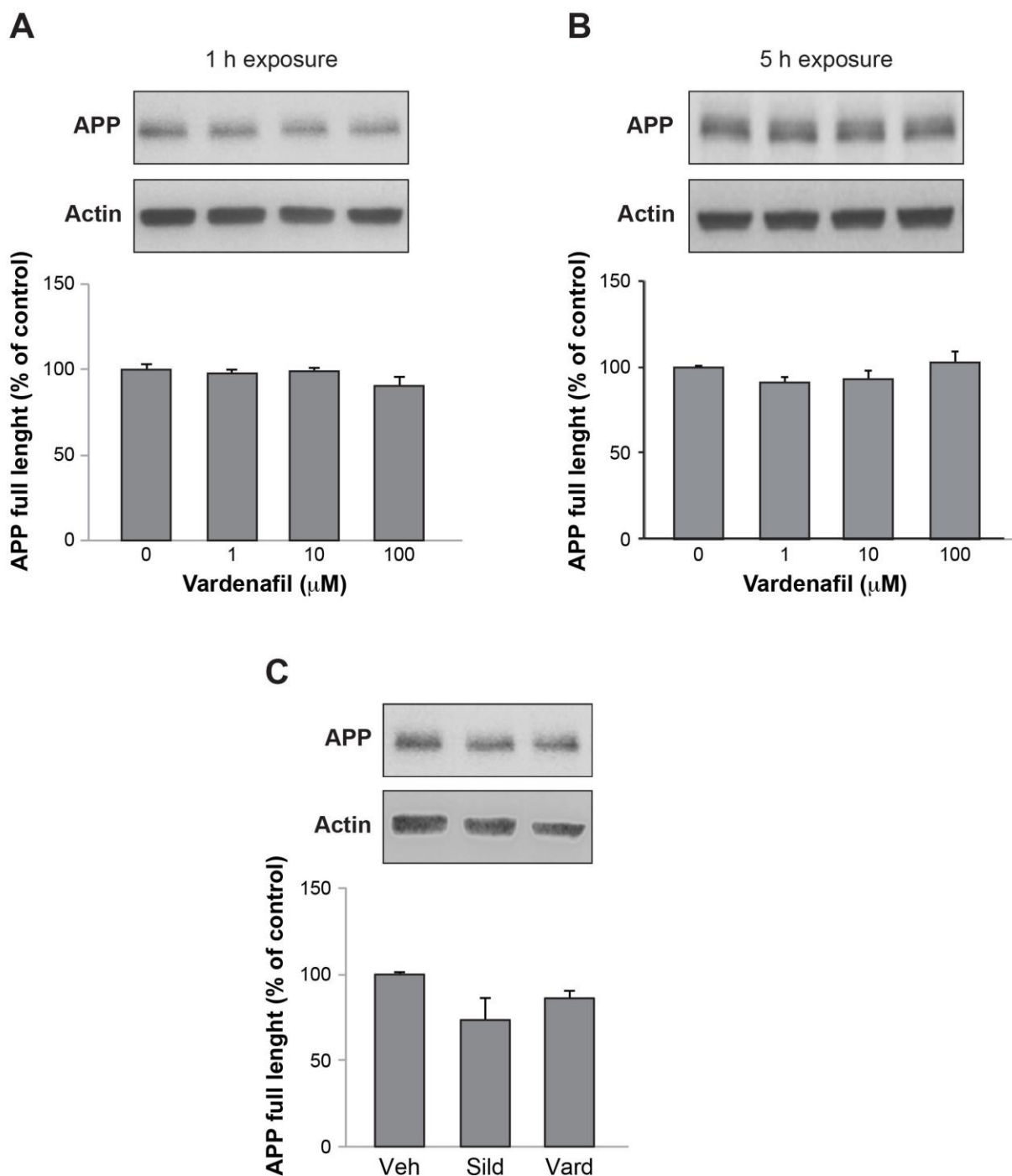


Fig.2 Il cGMP non modifica l'espressione di APP

A, B, Il trattamento con vardenafil a diverse concentrazioni in un range compreso tra 1 e 100 μ M non modifica l'espressione di APP full-length nelle cellule N2a né dopo 1 ora (**A**) né dopo 5 ore (**B**) di esposizione. **C,** Il trattamento con 100 μ M di sildenafil o vardenafil non modifica l'espressione di APP full-length nelle fettine di ippocampo. I risultati, normalizzati per i valori di actina, sono espressi come medie \pm SEM di tre esperimenti indipendenti.

1.4.3. La produzione di A β indotta dal cGMP non é mediata dalle PKG

Il cGMP attiva fisiologicamente due proteine bersaglio: le proteine chinasi 1 e 2 (PKG1 e PKG2). Per valutare il loro possibile coinvolgimento nell'aumento di A β , abbiamo effettuato il knockdown delle due chinasi nelle cellule N2a mediante siRNA specifici e abbiamo trattato le cellule con vardenafil. Al termine dei trattamenti, abbiamo quantificato i livelli di A β_{1-42} in ELISA nei terreni condizionati ed abbiamo verificato la down-regolazione delle PKG, tramite immunoblot, sugli estratti cellulari. Come mostrato in Fig. 3, ed in accordo con i risultati ottenuti in precedenza, il vardenafil aumenta significativamente la concentrazione di A β_{1-42} nei terreni di coltura delle cellule di controllo; tuttavia il silenziamento delle chinasi non previene tale effetto, dimostrando che l'aumento di amiloide indotto dal cGMP non è PKG-dipendente.

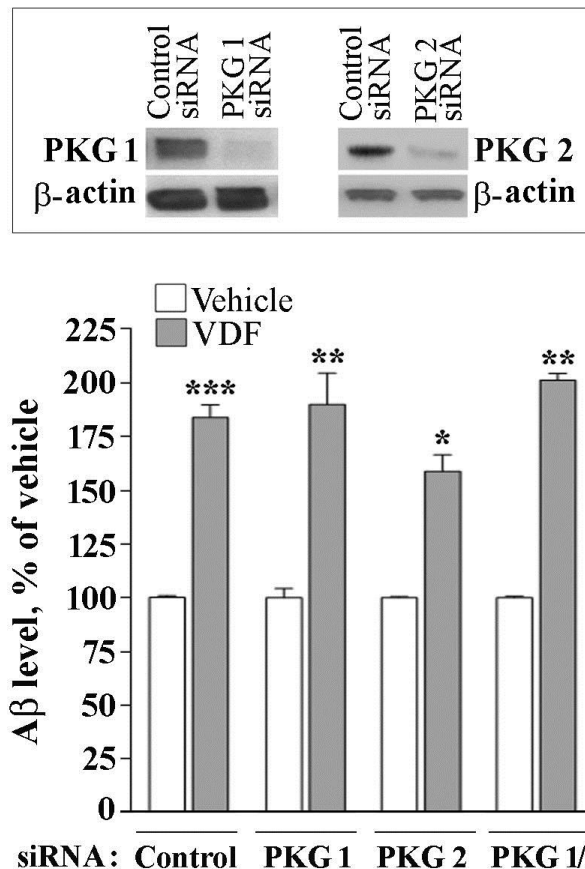


Fig. 3 La produzione di Aβ indotta dal cGMP non coinvolge PKG1 e PKG2

Le cellule N2a sono state transfettate con siRNA specifici per PKG1 e/o PKG2 per 48 ore. Le cellule sono poi state stimulate per un'ora con 100 μ M di vardenafil o con un volume uguale di veicolo (DMSO). Al termine del periodo di incubazione, i terreni condizionati sono stati sottoposti a test ELISA specifico per A β ₄₂, mentre le cellule sono state processate per l'estrazione totale di proteine, seguita da un'analisi in immunoblot con gli anticorpi anti-PKG1 e anti-PKG2. Il segnale della β -actina rappresenta il controllo interno di quantità di campione caricata. I dati, normalizzati per i valori densitometrici dell'actina, sono rappresentati come medie \pm SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0001$ vs il corrispondente gruppo trattato con il solo veicolo.

1.4.4. L'effetto del cGMP sulla produzione di A β necessita di β - e γ -secretasi

Dopo aver escluso l'effetto del cGMP sull'espressione di APP e sull'attività delle PKG, abbiamo investigato il processing del precursore di A β . Affinché venga prodotta l'amiloide sono necessari due tagli proteolitici consecutivi di APP, il primo operato dalla β -secretasi o BACE1 e il secondo operato dalla γ -secretasi.

Abbiamo quindi valutato se l'attività dei due enzimi fosse necessaria all'effetto indotto dal cGMP e, a tal fine, abbiamo trattato le cellule N2a con inibitori specifici per BACE1 (BACE inhibitor II) e γ -secretasi (Compound E), e le abbiamo quindi stimulate con il vardenafil. Come mostrato in Fig. 4A, nelle cellule in cui abbiamo inibito BACE1 o la γ -secretasi, l'incremento di cGMP non è più in grado di stimolare la produzione di A β , indicando che entrambi gli enzimi sono necessari all'effetto indotto dal nucleotide ciclico.

Successivamente, siamo andati a verificare se il cGMP potesse stimolare l'attività enzimatica di una o di entrambe le secretasi. Siamo partiti analizzando l'attività di BACE1. A tale scopo, abbiamo trattato le cellule N2a con vardenafil, abbiamo preparato gli estratti proteici e a questi abbiamo aggiunto un substrato specifico per BACE1, il quale diventa fluorescente se clivato dall'enzima. Tuttavia, come mostrato in Fig. 4B, il trattamento con vardenafil non ha indotto alcuna attivazione di BACE1.

Siamo quindi passati alla valutazione dell'attività γ -secretasica, utilizzando l'exo-cell assay (Shelton, Tian et al. 2009), metodica che ci ha permesso di quantificare l'attività dell'enzima in un sistema di cellule intatte (per i dettagli tecnici vedere la sezione Materiali e Metodi e la Fig. 4C).

Come si può osservare in Fig. 4C, il trattamento delle cellule con l'inibitore della γ -secretasi ha

abolito quasi completamente l'attività secretasica, confermando l'attendibilità del sistema nel nostro modello sperimentale. Tuttavia, anche in questo caso, il vardenafil, non è risultato stimolare l'attività della γ -secretasi, che sembra addirittura diminuire in seguito al trattamento (Fig. 4D). A spiegazione di questo fenomeno abbiamo avanzato due ipotesi: una in cui questa riduzione sia causata da un meccanismo compensatorio, a feedback negativo, indotto dall'aumento della produzione di $A\beta$, in seguito all'aumento del cGMP. Un'ipotesi alternativa potrebbe essere che la secretasi, o uno dei suoi componenti, venga internalizzata insieme ad APP, limitando in tal modo l'efficienza dell' "Exo-cell assay" che è in grado di valutare solo l'attività dell'enzima legato alla membrana plasmatica.

In conclusione, questi risultati indicano che l'effetto del cGMP sulla produzione di amiloide richiede la disponibilità di β - e γ -secretasi, ma escludono un effetto attivatorio del cGMP sui due enzimi.

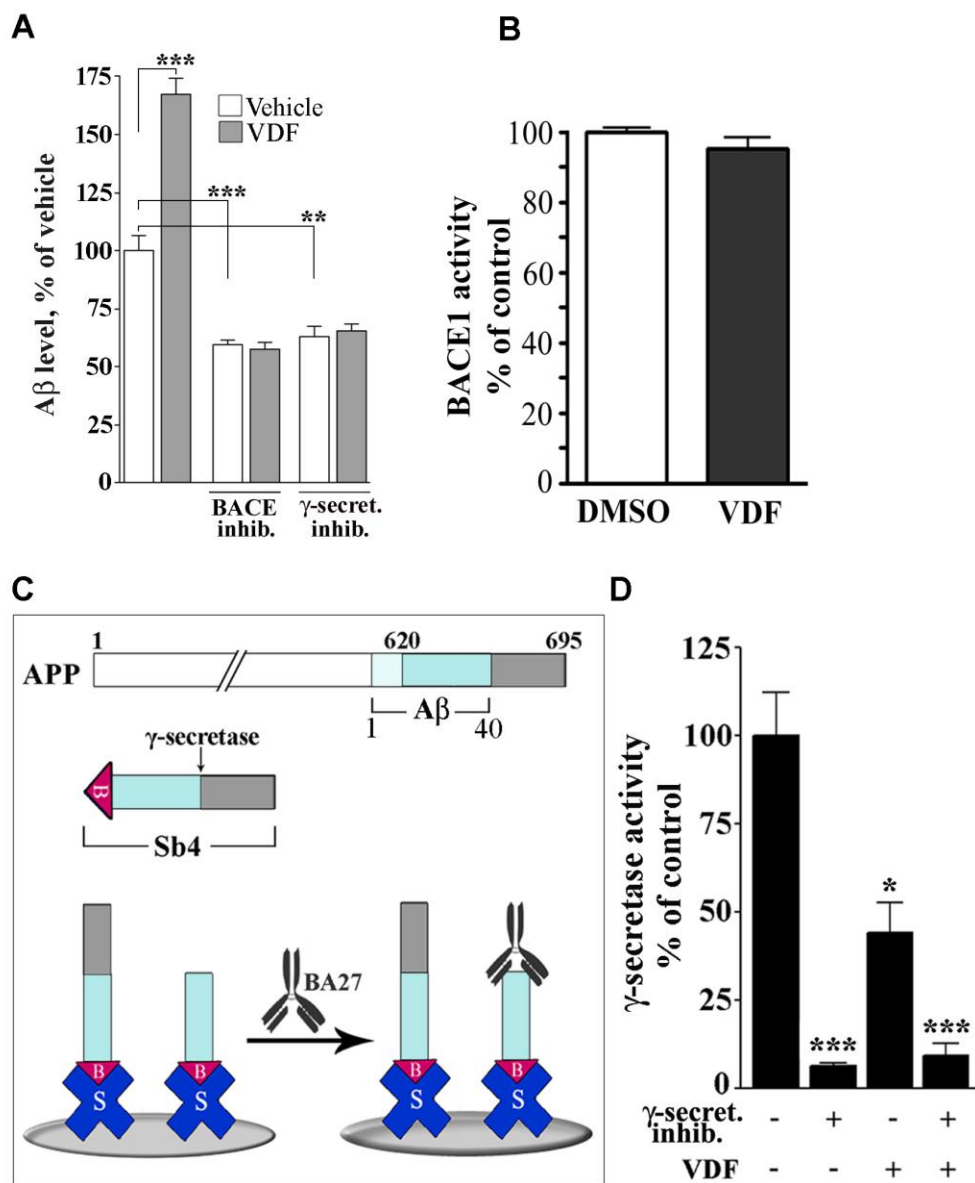


Fig.4 Il cGMP necessita dell'attivazione di β - e γ -secretasi per produrre A β

A, Le cellule N2a sono state trattate con 5 μ M di un inibitore di BACE1 (inibitore II della β -secretasi) o 1 μ M di un inibitore della γ -secretasi (Compound E) e quindi stimulate con 100 μ M di vardenafil o un volume pari di veicolo (DMSO) per 1 h. Nei terreni condizionati sono stati quantificati i livelli di A β_{42} mediante specifico test ELISA. **B**, Nelle cellule N2a, il trattamento con 100 μ M di vardenafil non modifica l'attività proteolitica di BACE1 su un substrato esogeno specifico della secretasi.. **C**, Rappresentazione grafica del saggio exo-cell e del substrato biotinilato (B) Sb4 che comprende gli amminoacidi 620–695 di APP695. Dove indicato, le cellule sono state pre-trattate con 1 μ M dell'inibitore della γ -secretasi (Compound E) per 6 ore. Le cellule sono poi state incubate con 1 μ M di Sb4 in terreno fresco contenente 0,25% di CHAPSO e 100 μ M di vardenafil, o un uguale volume di veicolo (DMSO), per un tempo ulteriore di 2,5 ore. Al termine dei trattamenti, 100 μ l di terreno condizionato di ogni campione sono stati caricati su una piastra di streptavidina (S) e usati per quantificare il prodotto della γ -secretasi mediante l'utilizzo dell'anticorpo BA27 legato alla perossidasi di rafano (HRP), che riconosce specificamente la porzione C-terminale di A β_{40} . I dati sono rappresentati come medie \pm SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti.* p < 0.05, ** p < 0.005 e *** p < 0.0001 rispetto ai controlli trattati con il veicolo.

1.4.5. Il cGMP stimola la produzione di A β favorendo la convergenza di APP e BACE-1 nei compartimenti endolisosomiali

Il clivaggio di APP operato da BACE1 é uno step limitante nella produzione di A β ; inoltre, l'approssimazione di APP e BACE1 rappresenta un evento essenziale nella generazione della β -amiloide.

Sulla base di ciò, abbiamo verificato se il cGMP potesse stimolare, nelle nostre condizioni sperimentali, la convergenza di APP e BACE1, fenomeno non rilevabile attraverso il saggio enzimatico utilizzato precedentemente (Fig. 4B). A tale scopo, abbiamo utilizzato l'OptiCAB assay, un metodo che si basa sulla complementazione bimolecolare dei frammenti della proteina Venus (Kerppola 2006), che ci ha permesso di valutare le interazioni intracellulari tra APP e BACE1 (Das, Wang et al. 2016).

Come illustrato in Fig. 5A, abbiamo utilizzato un costrutto in cui la sequenza di APP é legata a quella della porzione N-terminale della proteina Venus (VN), insieme ad un secondo costrutto esprimente BACE1 legata alla porzione C-terminale complementare della stessa proteina (VC). Il principio di questo saggio si basa sull'interazione dei due frammenti VN e VC nel momento in cui APP e BACE1 si avvicinano. Tale interazione produce un segnale fluorescente, poiché determina la ricostituzione di VENUS, che è appunto una proteina fluorescente (Das, Wang et al. 2016).

Abbiamo quindi transfettato le cellule N2a con i 2 costrutti, le abbiamo trattate con il vardenafil e le abbiamo analizzate in micriscopia confocale. Questo approccio sperimentale ci ha permesso di dimostrare che APP e BACE si avvicinano quando la concentrazione intracellulare di cGMP aumenta, come si può osservare nelle immagini in Fig. 5B.

Siccome studi recenti hanno dimostrato che le interazioni tra APP e BACE1 avvengono principalmente nei compartimenti endo/lisosomiali, dove il pH acido favorisce l'attività

proteolitica della secretasi (Das, Scott et al. 2013, Das, Wang et al. 2016), abbiamo utilizzato Lamp1:mCherry per marcare tali compartimenti in colture neuronali primarie. I risultati ottenuti, in linea con le recenti evidenze, hanno dimostrato che, in seguito al trattamento con vardenafil, si verifica un aumento significativo dell'interazione tra APP e BACE1 negli organelli Lamp1 positivi (Fig. 5C).

Questi dati avvalorano l'ipotesi che il cGMP stimoli il processing di APP favorendo la co-localizzazione di APP e BACE1 nei comparti endo-lisosomiali.

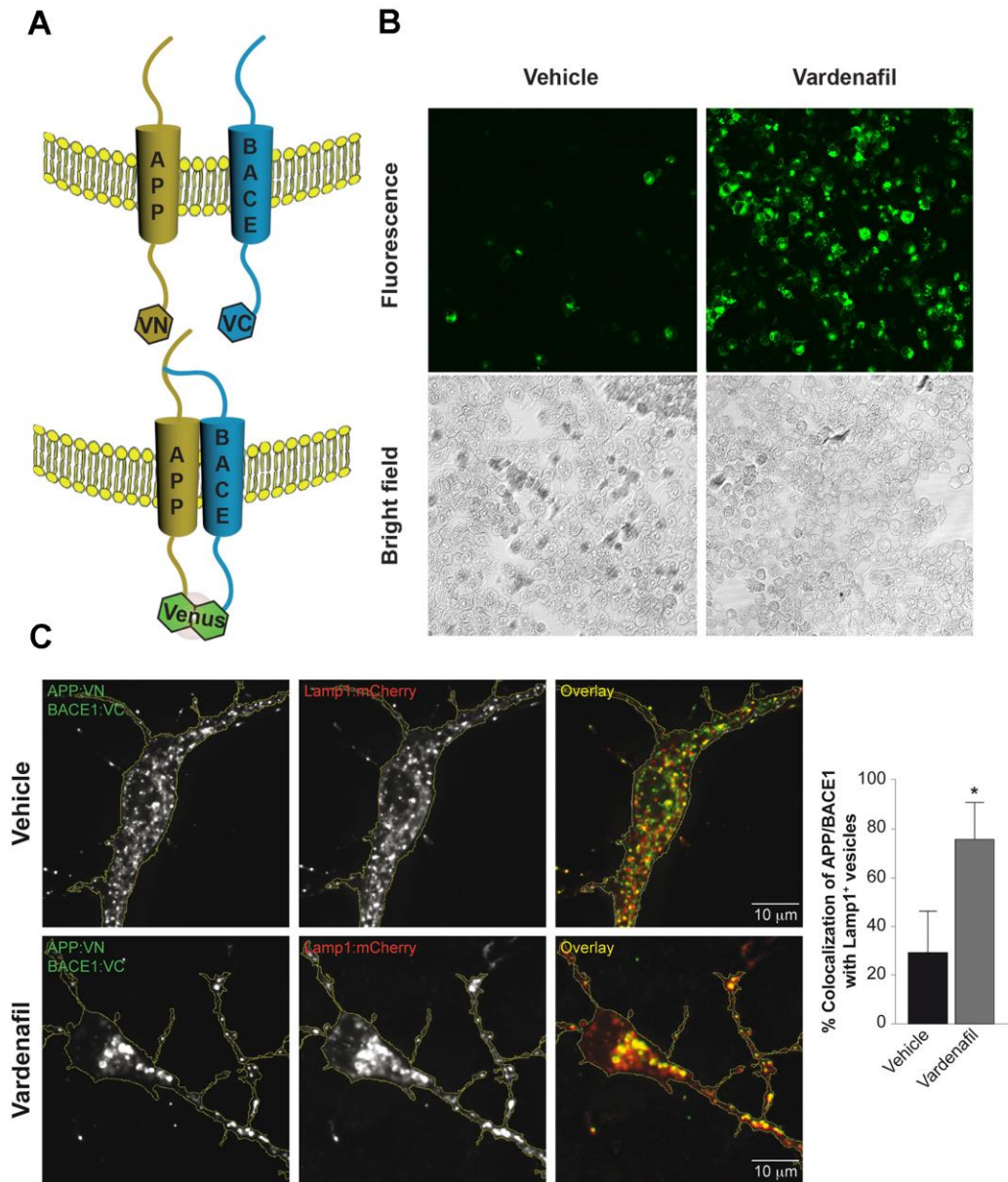


Fig. 5 Il cGMP induce l'interazione tra APP e BACE-1 nei compartimenti endo-lisosomiali.

A, Rappresentazione grafica del saggio OptiCAB usato per identificare le interazioni tra APP e BACE-1. APP e BACE-1 sono state legate rispettivamente ai frammenti VN e VC della proteina Venus. Quando APP interagisce con BACE-1, la proteina Venus viene ricostituita e diventa fluorescente. **B**, Immagini in microscopia confocale della fluorescenza emessa dalle cellule N2a esprimenti APP:VN e BACE-1:VC, e trattate per 16 ore con vardenafil (50 μ M) o veicolo (DMSO). **C**, Immagini in microscopia confocale della fluorescenza di neuroni primari esprimenti APP:VN, BACE-1:VC, e Lamp1:mCherry, in seguito al trattamento di 16 ore con vardenafil o veicolo (DMSO). Notare, nei campioni trattati con vardenafil, l'aumento della colocalizzazione dei punti Venus-positivi (che indicano l'interazione tra APP e BACE-1) con le vescicole Lamp1 positive, (indicatrici del compartimento endo/lisosomiale) rispetto ai controlli ($78.27 \pm 8.97\%$ vs $28.82 \pm 10.12\%$). N=10–12 neuroni per ogni condizione. I dati sono rappresentati come media \pm SEM. * $p < 0.05$.

1.4.6. Il cGMP richiede A β per sostenere la late-LTP

Numerosi studi hanno dimostrato che il cGMP gioca un ruolo centrale nell'LTP e nella plasticità sinaptica (Arancio, Kandel et al. 1995, Son, Lu et al. 1998, Lu, Kandel et al. 1999). A livello ippocampale, la stimolazione tetanica delle fibre presinaptiche determina un incremento dei livelli di cGMP (Monfort, Munoz et al. 2002) che, a sua volta, favorisce la plasticità sinaptica. I farmaci che stimolano la produzione di cGMP, come vardenafil e sildenafil, sono in grado di convertire la fase di E-LTP in L-LTP (Bollen, Puzzo et al. 2014).

Sulla base di queste nozioni, abbiamo innanzitutto testato l'attendibilità del nostro modello sperimentale, confermando che, nelle fettine di ippocampo murino stimulate tetanicamente a livello delle fibre collaterali di Schaffer, l'aumento di cGMP indotto dall'inibizione della PDE5 converte la E-LTP in L-LTP. A tale scopo, prima di essere stimulate con l'elettrodo, le fettine sono state perfuse per 10 minuti con Sildenafil (50 nM) (Puzzo, Staniszewski et al. 2009) o Vardenafil (10 nM) (Bollen, Puzzo et al. 2014). Come mostrato in Fig. 6A, entrambi i trattamenti hanno indotto una robusta L-LTP che perdura almeno 3 ore, diversamente dalle fettine trattate con il veicolo, dove il potenziamento è minore e si esaurisce dopo circa un'ora.

Alla luce di questi risultati, e sulla base di studi precedenti che suggerivano un ruolo ad A β nella stimolazione dell'LTP (Puzzo, Privitera et al. 2008, Puzzo, Privitera et al. 2012), abbiamo voluto verificare se anche la conversione dell' E-LTP in L-LTP operata dal cGMP dipendesse da A β .

A tale scopo, abbiamo testato se il vardenafil fosse ancora in grado di stimolare la L-LTP in assenza di A β . Per fare ciò abbiamo pre-trattato le fettine di ippocampo con un anticorpo monoclonale (M3.2) che riconosce selettivamente l'A β murina ed è in grado di bloccarla. Come mostrato in Fig. 6B, in queste condizioni sperimentali il vardenafil non riesce ad indurre la L-

LTP. Inoltre, l'anticorpo M3.2 da solo non modifica la E-LTP indotta da un tetano debole, escludendo quindi che sia l'anticorpo stesso a bloccare il potenziamento.

Dal momento che l'anticorpo M3.2 riconosce anche APP full length e suoi frammenti diversi da A β (β -CTF e APP α solubile), abbiamo effettuato un esperimento di *rescue* per verificare che fosse proprio A β ad essere implicata nel pathway molecolare, e non un altro target. A tal fine, abbiamo trattato le fettine con A β esogena umana, che non viene bloccata dall'anticorpo M3.2. Come mostrato in Fig. 6B, in presenza di M3.2 (che sequestra A β endogena, la cui produzione è indotta dal vardenafil), il trattamento con A β esogena umana riporta la L-LTP agli stessi livelli che si osservano in assenza dell'anticorpo, dimostrando quindi che la soppressione dell'LTP è dovuta, nello specifico, alla mancanza di A β .

Ad ulteriore conferma, abbiamo effettuato gli stessi esperimenti utilizzando ippocampi isolati da topi APP KO, che quindi non sono in grado di produrre A β . Come mostrato in Fig. 6C, nei campioni APP KO il trattamento con vardenafil non è stato in grado di sostenere l'LTP. Inoltre, l'aggiunta di A β_{42} sintetica ha ripristinato la L-LTP indotta dallo stimolo tetanico.

Nel loro insieme, questi risultati dimostrano che la conversione della E-LTP in L-LTP indotta dal cGMP necessita di A β .

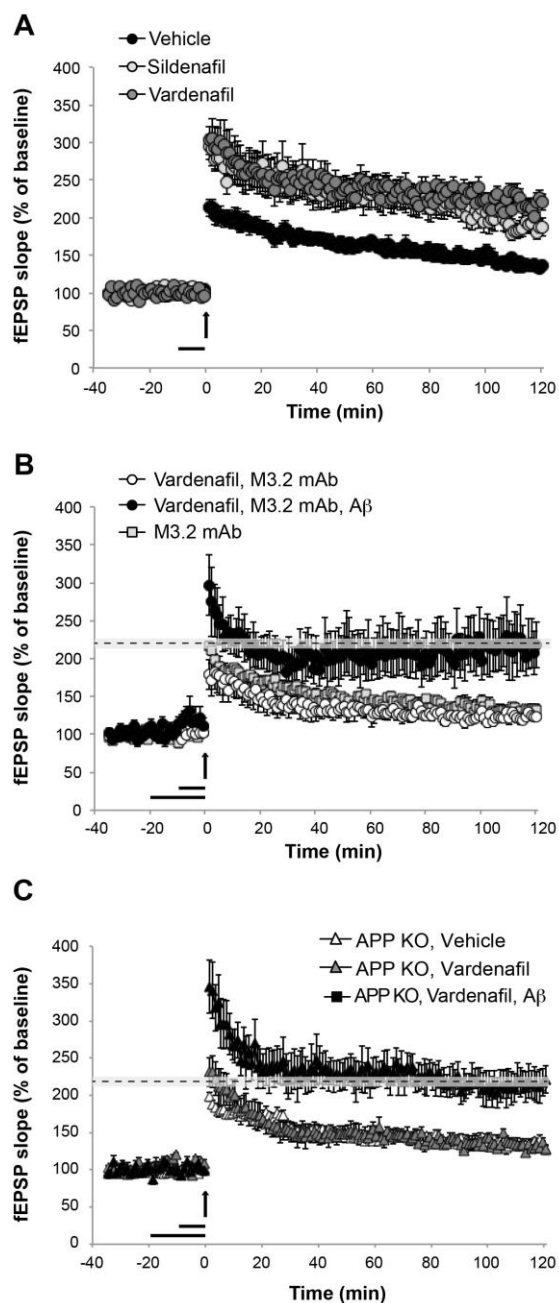


Fig. 6 La conversione dell'E-LTP in L-LTP indotta dal cGMP richiede il rilascio di A β .

A, La perfusione delle fettine d'ippocampo con 50 nM di sildenafil o 10 nM di vardenafil prima di un tetano debole è in grado di convertire la E-LTP in L-LTP (veicolo: $n=7$; $134.96 \pm 4.19\%$ della pendenza della linea di base 180 minuti dopo il tetano; sildenafil: $n=5$; $196.72 \pm 11.11\%$ della pendenza della linea di base; vardenafil: $n=7$; $214.86 \pm 11.75\%$ della pendenza della linea di base). La L-LTP indotta dai PDE5-I è comparabile alla L-LTP evocata da un tetano forte ($n=7$; $227.41 \pm 6.79\%$ della pendenza della linea di base 180 minuti dopo il tetano). **B**, La concomitante perfusione con un anticorpo monoclonale anti-A β (M3.2 mAb; 2 $\mu\text{g/ml}$) per 20 minuti prima di un tetano debole, blocca l'effetto del vardenafil sull'LTP ($n=7$; $123.25 \pm 4.60\%$ della pendenza della linea di base 180 minuti dopo il tetano).

1.4.7. Il cGMP richiede A β per migliorare la performance cognitiva

Alla luce dei risultati ottenuti, ci siamo chiesti se anche l'effetto del cGMP sulla memoria fosse mediato da A β . A tal fine, è stato eseguito l'Object Recognition Test (ORT) su topi WT e topi APP KO. L'ORT sfrutta la propensione naturale dei roditori ad esplorare oggetti a loro sconosciuti e permette di valutare l'integrità delle funzioni ippocampali e paraippocampali legate ai processi mnemonici (Broadbent, Gaskin et al. 2010). Nel nostro studio, dopo 3 giorni di ambientamento, i topi sono stati sottoposti al periodo di training (T1), durante il quale hanno potuto esplorare due oggetti identici per 3 minuti. Al termine del periodo T1, i topi sono stati trattati per via intraperitoneale con 1 mg/kg di vardenafil o con DMSO (veicolo). Dopo 24 ore, (tempo necessario affinché si verifichi il cosiddetto *forgetting* fisiologico), i topi sono stati nuovamente posti nell'arena, contenente un'oggetto già presente nel periodo T1 (oggetto familiare) e un oggetto nuovo. Durante il test, della durata di 3 minuti, è stato registrato il tempo di esplorazione per ciascuno dei due oggetti (periodo T2).

Come dimostrato precedentemente da Bollen et al. (Bollen, Puzzo et al. 2014), il trattamento con vardenafil migliora la memoria. Infatti, come si può osservare in Fig. 7A, gli animali trattati con il vardenafil impiegano più tempo nell'esplorare l'oggetto nuovo in T2, rispetto a quello familiare. Tuttavia, non si osserva questo effetto nei topi APP KO, i quali non sono in grado di produrre A β , confermando i risultati ottenuti in elettrofisiologia.

Nei topi WT trattati con il veicolo non vi è differenza tra il tempo impiegato ad esplorare l'oggetto nuovo e quello impiegato per esplorare l'oggetto familiare perchè l'intervallo tra T1 e T2 è lungo (24h), quindi gli animali dimenticano fisiologicamente l'oggetto che dovrebbe invece essere "familiare".

I tempi di esplorazione per ciascun oggetto sono stati utilizzati per calcolare l'indice di discriminazione (D), che è una misura dell'apprendimento ed è calcolato come il rapporto tra la differenza tra il tempo di esplorazione dell'oggetto nuovo e quello dell'oggetto familiare e il tempo di esplorazione totale.

Come riportato in Fig. 7B, l'indice di discriminazione è significativamente diverso da 0 solo nei topi WT trattati con vardenafil, dimostrando che solo questi topi sono in grado di riconoscere l'oggetto "familiare". Inoltre, non sono state rilevate differenze significative nel tempo di latenza né in quello di esplorazione totale, suggerendo che il trattamento con vardenafil non influisce né sull'ansia né sull'attività motoria (Fig. 7C-D).

Questi risultati dimostrano che nei topi APP KO, che non possono produrre A β , il trattamento con vardenafil non migliora la performance cognitiva nel test ORT, corroborando l'ipotesi che il cGMP migliori la memoria stimolando la produzione di A β .

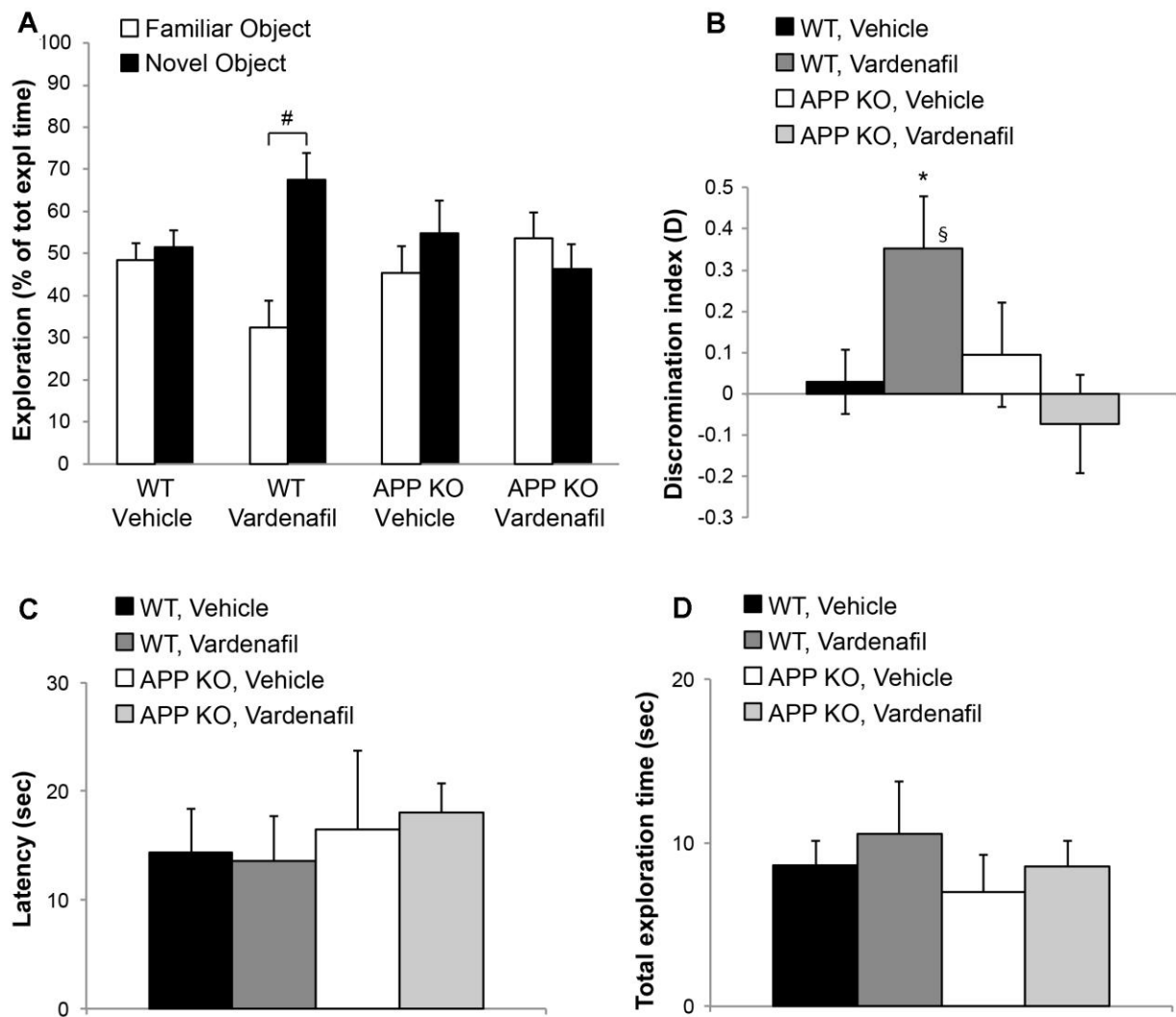


Fig.7 Nei topi APP KO il vardenafil non migliora la memoria di riconoscimento

A, Tempi di esplorazione dell'oggetto nuovo e familiare durante il periodo T2 (dopo un intervallo di ritenzione di 24 h). Il grafico mostra come i topi WT trattati con vardenafil impieghino più tempo nell'esplorare l'oggetto nuovo rispetto a quello familiare ($n = 12$; $65.45 \pm 6.34\%$ vs $32.43 \pm 6.34\%$ del tempo di esplorazione totale). Al contrario, il vardenafil non è in grado di stimolare la memoria nei topi APP KO ($n=13$; $46.32 \pm 5.93\%$ vs $53.67 \pm 5.93\%$ del tempo di esplorazione totale). I topi WT e APP KO trattati con il veicolo impiegano la stessa quantità di tempo nell'esplorare l'oggetto familiare e quello nuovo (WT: $n=12$; $51.47 \pm 3.9\%$ vs $48.52 \pm 3.9\%$ del tempo di esplorazione totale; APP KO: $n=12$; $54.72 \pm 7.87\%$ vs $45.27 \pm 7.87\%$ del tempo di esplorazione totale), confermando che "dimenticano" in maniera fisiologica dopo 24 ore dal periodo di training. **B**, L'analisi dell'indice di discriminazione (D) conferma che il vardenafil non stimola la memoria di riconoscimento nei topi APP KO. Il periodo di latenza fino al primo approccio con l'oggetto nuovo (**C**) e il tempo di esplorazione totale (**D**) sono confrontabili nei quattro gruppi di topi. $*p < 0.05$; $\#p < 0.0001$; \S diverso da 0. I dati sono rappresentati come media \pm SEM.

1.5. Discussione

**Il ruolo del cGMP e di A β nei processi
di formazione della memoria**

La chiara evidenza che A β sia fisiologicamente prodotta dai neuroni emerse nei primi anni '90, quando fu dimostrato che i livelli di amiloide presenti nel fluido cerebrospinale di pazienti AD sono comparabili con quelli di soggetti sani (Tamaoka, Sawamura et al. 1997). Più recentemente, inoltre, è stato dimostrato che concentrazioni picomolari di questo peptide sono in grado di modulare positivamente la plasticità sinaptica e la memoria (Puzzo, Privitera et al. 2008, Puzzo, Privitera et al. 2011, Fedele, Rivera et al. 2015, Gulisano, Maugeri et al. 2018).

In questo contesto, è noto da tempo che i nucleotidi ciclici cAMP e cGMP svolgono un ruolo fondamentale nell'induzione dell'LTP, favorendo quindi i processi cognitivi. Il cAMP, infatti, influenza in maniera positiva la L-LTP, equivalente molecolare della memoria a lungo termine, mentre il cGMP è coinvolto nella l'E-LTP, equivalente di quella a breve termine (Son, Lu et al. 1998, Kleppisch and Feil 2009, Kandel 2012, Heckman, Wouters et al. 2015, Ricciarelli and Fedele 2015).

Gli studi condotti negli ultimi anni nel laboratorio in cui lavoro hanno dimostrato che la L-LTP sostenuta dal cAMP richiede la sintesi di APP e la produzione di A β (Canepa, Domenicotti et al. 2013, Ricciarelli, Puzzo et al. 2014).

Sulla base di queste premesse, lo scopo della mia tesi è stato quello di verificare se anche il cGMP richiedesse A β per sostenere l'E-LTP e, in tal caso, quali fossero i meccanismi molecolari di correlazione tra il cGMP e A β .

I dati ottenuti dimostrano che gli inibitori della PDE5, quali sildenafil e vardenafil, inducono un aumento di produzione di A β proporzionale all'incremento intracellulare di cGMP, sia nelle cellule di neuroblastoma sia nelle fettine di ippocampo di ratto. Questo effetto si riduce drasticamente in seguito all'inibizione selettiva della guanilato ciclasi, l'enzima deputato alla sintesi di cGMP, confermando la correlazione diretta tra produzione di A β e nucleotide ciclico.

Abbiamo inoltre dimostrato che, diversamente da quanto osservato per il cAMP (Canepa, Domenicotti et al. 2013, Ricciarelli, Puzzo et al. 2014), il cGMP stimola la produzione di A β senza agire sull'espressione del suo precursore APP.

Inoltre, investigando i meccanismi molecolari con cui il cGMP influenza la produzione di A β , abbiamo potuto escludere il coinvolgimento dei due diretti target del cGMP, PKG1 e PKG2, mediante l'utilizzo di siRNA specifici.

Analizzando l'effetto del nucleotide ciclico sull'attività enzimatica di β -secretasi (BACE1) e γ -secretasi, necessarie alla produzione di A β , abbiamo osservato che, per aumentare la sintesi di amiloide, il cGMP richiede entrambi gli enzimi senza però stimolarne l'attività proteolitica.

Tuttavia, siccome numerose evidenze dimostrano che il taglio di APP operato da BACE1 è lo step limitante nella produzione di A β (O'Brien and Wong 2011), e che questo si verifica prevalentemente nei compartimenti neuronali endo/lisosomiali (Thinakaran and Koo 2008, Das, Scott et al. 2013, Wilkins and Swerdlow 2017), abbiamo testato l'effetto del vardenafil sull'interazione tra APP e BACE1. L'impiego dell'OptiCAB assay ci ha permesso di verificare che il cGMP, seppur non attivando direttamente BACE1, favorisce l'avvicinamento tra la β -secretasi e il suo substrato APP nei compartimenti endo/lisosomiali, il cui ambiente acido favorisce il processing amiloidogenico.

Tali risultati sono in accordo con un recente studio in cui si dimostra che, in modelli murini, il trattamento con sildenafil stimola il metabolismo di APP e l'aumento di A β_{42} (Bollen, Puzzo et al. 2014).

È noto da tempo che l'aumento dei livelli di cGMP induca la conversione dell'E-LTP in L-LTP. In base ai nostri risultati, tale effetto è abrogato dagli anticorpi anti-amiloide, che bloccano il

peptide, e nei topi APP KO (che non possono produrre A β), indicando chiaramente che il cGMP necessita di A β per sostenere l'LTP ippocampale.

Questi risultati sono in linea con numerose evidenze che dimostrano come la stimolazione del pathway molecolare NO/cGMP partecipi al processo di formazione e consolidamento della memoria (Prickaerts, van Staveren et al. 2002, Rutten, Basile et al. 2008, Bollen, Puzzo et al. 2014, Prickaerts, Van Goethem et al. 2017) e con gli studi condotti da Arancio e Puzzo, con cui collaboriamo, che hanno dimostrato che concentrazioni picomolari di A β sono necessarie all'LTP e alla formazione della memoria (Puzzo, Privitera et al. 2011).

Sulla base di queste evidenze, abbiamo investigato se vi fosse una correlazione tra la produzione di A β , indotta dal cGMP, e la performance cognitiva, ottenendo risultati analoghi a quelli osservati in elettrofisiologia.

Come già ribadito in precedenza, numerose evidenze indicano un ruolo fondamentale di cAMP e cGMP nella regolazione dei processi di neuroplasticità, ipotizzando l'utilizzo di molecole in grado di inibire la degradazione dei due nucleotidi ciclici nella terapia del deficit cognitivo.

Nella malattia di Alzheimer, tuttavia, il deficit cognitivo è accompagnato dall'accumulo cerebrale di A β , e i dati da noi ottenuti indicano chiaramente che l'inibizione della PDE5, sebbene migliori l'LTP e la performance mnemonica, stimoli al contempo la produzione di amiloide.

I nostri risultati, quindi, appaiono certamente controversi rispetto ad altri che suggeriscono di utilizzare gli inibitori delle PDE per ridurre i livelli di A β (Puzzo, Staniszewski et al. 2009, Zhang, Guo et al. 2013, Zhu, Yang et al. 2015). Tuttavia, sebbene gli esperimenti in questione, a differenza dei nostri, siano stati condotti in modelli animali di AD che overproducono A β , occorre evidenziare che il trattamento cronico con inibitori delle PDE ha determinato un

miglioramento della performance cognitiva anche nei modelli AD (Prickaerts, van Staveren et al. 2002, Gong, Vitolo et al. 2004, Puzzo, Staniszewski et al. 2009).

Inoltre, è importante sottolineare che sia l'amiloide sia il cGMP inducono un effetto ormetico (Andoh, Chiueh et al. 2003, Puzzo, Privitera et al. 2012) che si traduce in una risposta cellulare diversa a seconda della concentrazione. Il nitroprussiato, (donatore di NO), ad esempio, modula il processing di APP in maniera bidirezionale, in base alla dose utilizzata (Cai, Guo et al. 2016).

Si può quindi ipotizzare che, in condizioni fisiologiche, l'incremento di cGMP favorisca la plasticità sinaptica e la formazione dei processi cognitivi attraverso la produzione di A β . Diversamente, nella malattia neurodegenerativa, possiamo delineare due possibili scenari:

- 1) Il danno causato dal forte accumulo di amiloide prevale sugli effetti fisiologici del peptide (visione amiloidogenica, che tuttavia non spiega il perché dell'accumulo).
- 2) La funzione fisiologica di A β viene a mancare per difetti a monte o a valle della sua produzione. In questo caso, l'accumulo di amiloide potrebbe rappresentare un tentativo compensatorio, e non la causa di malattia.

In conclusione, i nostri risultati dimostrano che:

- Il cGMP stimola il processing di APP e tale effetto non coinvolge le PKG1/2, né la gamma secretasi, ma sembra invece dipendere da un'aumentata interazione di BACE e APP.
- Tale interazione avviene in strutture distinte, verosimilmente comparti endo-lisosomiali, il cui ambiente acido favorisce l'attivazione di BACE.
- L'effetto positivo del cGMP sull'LTP e sulla performance mnemonica è mediato da A β .

Possiamo quindi affermare che nei processi cognitivi vi sia una stretta correlazione tra cGMP e $A\beta$, con il nucleotide che agisce a monte di $A\beta$, regolandone la produzione, condizione *sine qua non* affinché si possano instaurare i fisiologici processi mnemonici.

Strategie farmacologiche in grado di inibire la PDE5 potrebbero quindi rappresentare un approccio terapeutico efficace nel trattamento della malattia di Alzheimer e dei deficit cognitivi in generale. È dunque auspicabile che, in breve tempo, l'impiego degli inibitori PDE5 (almeno quelli già disponibili in commercio) possa essere ottimizzato per gli effetti sul sistema nervoso centrale.

Capitolo 2: Caratterizzazione di nuovi HAT attivatori per la terapia della malattia di Alzheimer

2.1. Background molecolare

Caratterizzazione di nuovi HAT attivatori
per la terapia della malattia di Alzheimer

2.1.1. Epigenetica

L'epigenetica viene definita come lo studio dei meccanismi di regolazione della trascrizione genica, attraverso modificazioni che non intervengono direttamente sulla sequenza primaria del DNA, ma sulla sua struttura e sulle proteine ad esso associate. Tali modifiche regolano l'accesso dei fattori di trascrizione ai loro siti di legame sul DNA e controllano in modo diretto lo stato di attivazione funzionale dei geni. I fattori di trascrizione, sono proteine che si legano a specifiche sequenze di regolazione poste sul DNA, e svolgono un ruolo cruciale nella trascrizione genica, stimolando o reprimendo l'attivazione di singoli geni deputati alla sintesi di proteine essenziali per le funzioni cellulari.

I livelli di trascrizione genica sono controllati dal maggiore o minore livello di "impacchettamento" della cromatina, che é organizzata in strutture denominate nucleosomi.

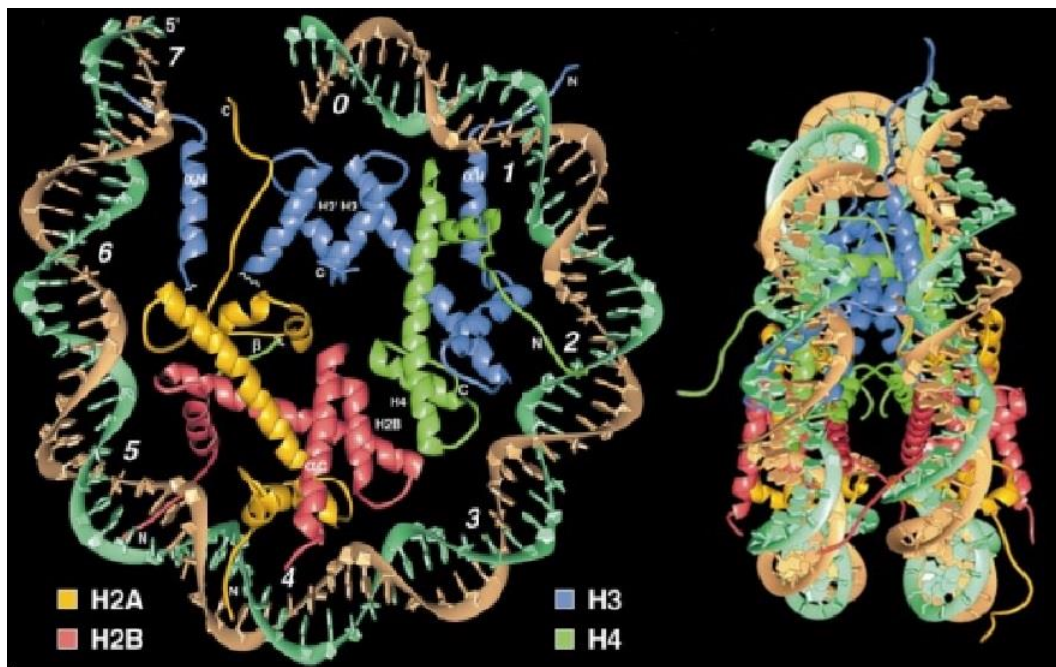


Fig.1 – Struttura del nucleosoma

Rappresentazione della struttura del nucleosoma, subunità fondamentale della cromatina. Esso è costituito da 146 bp di DNA (marrone e turchese) avvolte attorno a un ottamero costituito da 8 proteine istoniche (blu: H3; verde: H4; giallo: H2A; rosso: H2B) (Luger, Mader et al. 1997).

Il nucleosoma consta di 146 paia di basi avvolte circa due volte attorno a un complesso molecolare costituito da un ottamero di piccole proteine basiche, gli istoni (Luger, Mader et al. 1997).

Quest'ultimi sono quattro proteine nucleari, H2A, H2B, H3, e H4, che hanno un peso molecolare compreso tra gli 11 e i 16 KDa e presentano una grossa quantità di residui lisinici, carichi positivamente, in grado di legarsi in maniera aspecifica ai gruppi fosfato del DNA, carichi negativamente.

L'ottamero istonico è costituito dal tetramero $(H3)_2-(H4)_2$ e da due eterodimeri H2A e H2B (Luger, Mader et al. 1997) (Fig.1).

Oltre a questi quattro istoni, è stato identificato anche l'istone H1, che non interviene nella formazione del nucleosoma, ma è deputato al collegamento dei nucleosomi adiacenti e svolge un ruolo chiave nel compattamento della cromatina.

Strutturalmente, ogni istone presenta un corpo globulare ed, alla sua estremità N-terminale, una coda flessibile che può essere sottoposta a varie modifiche post-trasduzionali (Luger, Mader et al. 1997).

Queste modifiche sono in grado di determinare cambiamenti a livello della configurazione nucleosomica e in tal modo, facilitare ai fattori di trascrizione, l'accesso al DNA, in modo da sintonizzare tutti i processi mediati dalla cromatina, tra cui la trascrizione genica, la condensazione della cromatina stessa, la riparazione del danno del DNA e la replicazione del DNA (Onder, Sidoli et al. 2015).

Infatti, in condizioni di ridotta attivazione, la stretta associazione elettrostatica tra il DNA e le proteine istoniche, comporta una configurazione nucleosomica chiusa, chiamata eterocromatina,

che impedisce il legame dei fattori di trascrizione. Al contrario il passaggio a una configurazione più 'rilassata', chiamata eucromatina, che dipende da modifiche post-trasduzionali a carico degli istoni, ne facilita l'accesso.

Sono state identificate molte modificazioni istoniche quali acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, sumoilazione, biotinilazione, propionilazione, butirilazione, carbonilazione, neddilazione, isomerizzazione della prolina, glicosilazione, citrullinazione e poli-ADP ribosilazione.

Gli enzimi che si occupano di queste modifiche sono stati suddivisi in tre classi: *writers*, *readers* ed *erasers*. Le molecole *writers* catalizzano l'aggiunta di un gruppo chimico sugli istoni; le *readers* sono le molecole effettrici che riconoscono specifiche modifiche epigenetiche; le *erasers* rimuovono le modifiche per invertirne l'influenza sull'espressione genica.

Negli ultimi decenni l'interesse per le modifiche epigenetiche è accresciuto dal fatto che esse sembrano avere un ruolo rilevante, se non fondamentale, nella patogenesi di numerose e diffuse patologie come il diabete di tipo II, l'obesità, le malattie cardiovascolari, i disordini neurodegenerativi, le malattie autoimmuni ed il cancro.

Le conoscenze riguardanti l'epigenetica si sono notevolmente ampliate, tuttavia molti aspetti rimangono ancora da studiare ed approfondire.

2.1.2. Acetilazione

Tra le numerose modifiche post-trasduzionali individuate, l'acetilazione svolge un ruolo chiave nella plasticità sinaptica e nei meccanismi di apprendimento e memoria. Si è pertanto ipotizzato che un'alterazione di questo meccanismo possa essere alla base della patogenesi della malattia di Alzheimer. Quindi, al fine di questo lavoro, verrà discussa solo l'acetilazione.

L'acetilazione post-traslazionale degli istoni, è una reazione che dipende dall'attività di due enzimi: le acetiltransferasi (HAT, dall'inglese *Histone AcetylTransferase*, *writers* dell'acetilazione) e le deacetiltransferasi (HDAC, dall'inglese *Histone DeAcetylTransferase*, *erasers* dell'acetilazione) istoniche, che catalizzano rispettivamente l'aggiunta o la rimozione di un gruppo acetilico a livello delle code istoniche (Gershey, Vidali et al. 1968) e svolgendo quindi il ruolo di *writers* ed *erasers* dell'acetilazione (Fig.2).

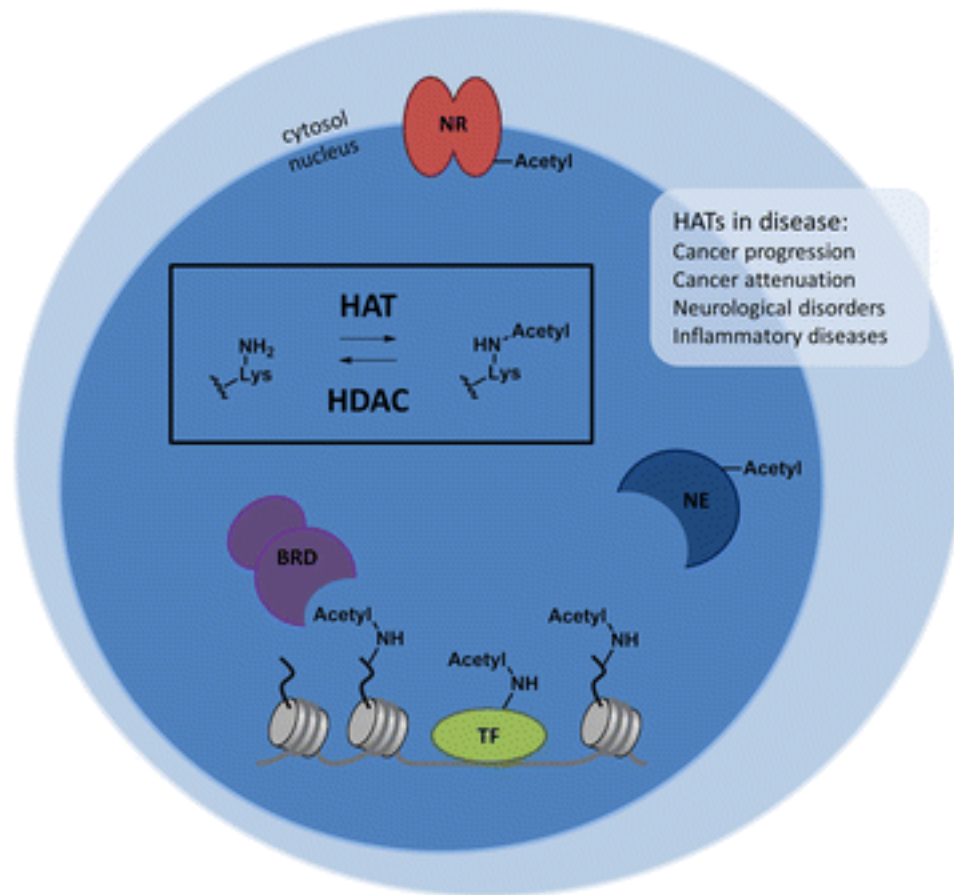


Fig.2 – L'acetilazione degli istoni altera la struttura della cromatina

L'acetilazione della lisina è una reazione bilanciata dall'attività sinergica delle acetiltransferasi (HATs) e dalle deacetiltransferasi (HDACs) istoniche. L'acetilazione dei residui lisinici delle code istoniche modifica la struttura della cromatina e consente ai fattori di trascrizione di legare il DNA attivando la trascrizione genica e influenzando le funzioni cellulari. NR: recettore nucleare, BRD: bromodominio, NE: enzima nucleare, TF: fattore di trascrizione (Wapenaar and Dekker 2016).

Il gruppo acetile viene trasferito dall'acetil coenzima A (Ac-CoA) su due siti specifici dell'istone: sulla porzione N-terminale delle catene polipeptidiche, mediante un legame irreversibile, oppure sul gruppo amminico ϵ di lisine specifiche.

Nello specifico, l'acetilazione dei residui lisinici neutralizza la carica positiva degli istoni, destabilizzando in tal modo l'interazione con il DNA. Ciò si traduce nell'apertura della struttura cromatinica (eucromatina) consentendo l'accesso a specifici fattori di trascrizione e favorendo il meccanismo generale di trascrizione (Shogren-Knaak, Ishii et al. 2006). Al contrario, la reazione di deacetilazione che determina la rimozione dei gruppi acetile, riduce localmente i livelli di trascrizione del gene.

I livelli di acetilazione dei residui lisinici sono quindi regolati sinergicamente dall'azione opposta delle HDAC e delle HAT.

Nel 2007, Allis et al. hanno proposto una nuova nomenclatura per identificare tutti i membri caratterizzati delle famiglie di questi enzimi. Infatti, poichè è stato dimostrato che essi agiscono anche su proteine non istoniche, gli è stato assegnato un nome più generico che riflette il tipo di attività enzimatica che svolgono e il tipo di residuo che modificano, ovvero KAT (K-acetiltransferasi; dove K sta ad indicare la Lisina secondo il codice a una lettera degli amminoacidi), e KDAC (K-deacetiltransferasi) (Allis, Berger et al. 2007).

2.1.2.1. HDAC

Ad oggi nell'uomo sono stati identificati 18 tipi di HDAC che possono essere classificate in quattro classi sulla base della loro omologia alle deacetilasi di lievito, della loro localizzazione subcellulare e della loro attività enzimatica (Khochbin 2011). Esse sono state raggruppate in quattro classi:

Classe I: che comprende HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8

Classe II: che comprende HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10

Classe III o sirtuine: Sir1-7

Classe IV: HDAC11

Tutti questi enzimi, ad eccezione delle sirtuine, presentano un dominio catalitico zinco dipendente attraverso cui deacetilano i loro substrati, ed una tasca idrofobica che permette l'inserimento della lisina istonica. Le sirtuine, invece, sono NAD⁺ dipendenti, e differiscono dalle altre per il sito catalitico.

Nello specifico, le HDAC umane appartenenti alla classe I (HDAC1, 2, 3 e 8) sono state le prime ad essere identificate e sono analoghe alla deacetilasi di lievito Rpd3. Esse sono cruciali per la repressione trascrizionale e per il controllo epigenetico. Inoltre é interessante notare che le HDAC1 e 2 sono le componenti del complesso che inattiva l'espressione dei geni neuronali in tessuti non neuronali (Huang, Myers et al. 1999).

Le HDAC appartenenti alla classe II (4, 5, 6, 7, 9 e 10), ulteriormente suddivise in classe IIa (4, 5, 7, e 9) e classe IIb (6 e 10), sono caratterizzate da un dominio simile a quello della deacetilasi di lievito Hda1, e hanno dimensioni due o tre volte maggiori quelle della prima classe (100-130 kD).

Le classi I e II sono localizzate sia nel citoplasma che nel nucleo, dove principalmente sono deputate a mediare la repressione della trascrizione dei geni correlati al differenziamento, e dove partecipano alla regolazione del ciclo cellulare. Esse sono quelle maggiormente coinvolte nella regolazione epigenetica, infatti sono associate a fattori di trascrizione oncogeni e rappresentano potenziali target per piccole molecole inibitrici.

Come i membri della classe I, le HDAC di classe II agiscono in complessi multi-proteici, e sono sensibili all'azione di noti inibitori delle HDAC , come il SAHA e la Tricostatina A (TSA).

Nonostante ciò, le HDAC di classe II sembrano interagire con una serie di proteine diverse da quelle con cui interagiscono quelle di classe I.

Le HDAC di classe III (SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) sono omologhi della proteina Sir2 del lievito e richiedono la presenza di NAD^+ per esplicare la loro attività di regolazione genica in risposta a cambiamenti dello stato ossidoriduttivo della cellula.

E' stato dimostrato che SIRT1 interagisce anche con la proteina non istonica p53, deacetilandola e quindi, reprimendone la trascrizione (Lee and Gu 2013).

Infine, l'unico membro della classe IV è HDAC11. Quest'ultima presenta la sequenza del sito catalitico simile a quella delle prime due classi, ma la restante parte è sostanzialmente diversa e non permette quindi di collocarla nelle suddette classi. La funzione di questa HDAC non è ancora stata del tutto compresa.

2.1.2.2. HAT

Ad oggi sono state identificate circa 17 HAT con attività acetiltransferasica. Tale numero sale a 22 se si considerano gli enzimi che catalizzano anche altre reazioni.

Le HATs umane possono essere classificate in base alla loro localizzazione in HAT di tipo A e HAT di tipo B. Le HAT di tipo B (KAT1, HAT4) sono enzimi citoplasmatici che modificano gli istoni liberi nel citoplasma subito dopo la loro sintesi, che in seguito vengono trasportati nel nucleo e integrati nel DNA di nuova sintesi (Parthun, Widom et al. 1996). Le HAT di tipo A, invece, sono enzimi principalmente nucleari e sono responsabili dell'acetilazione di istoni e proteine non istoniche localizzate a questo livello.

Le HATs possono anche essere classificate sulla base della loro omologia di sequenza in 5 grandi famiglie (Tabella 1) (Graff and Tsai 2013):

1. la famiglia GNAT (dall'inglese *Gnc5-related N-acetyltransferase*) che è composta da KAT2A e KAT2B
2. la famiglia MYST (che include i geni MOZ, Ybf2 / Sas3, SAS2 e Tip60) che è la famiglia più grande e comprende KAT5, 6A e 6B, 7 e 8
3. la famiglia p300/CBP (dall'inglese CREB binding protein) che è composta da KAT3A e 3B.

Altre HATs, oltre a possedere l'attività acetiltransferasica, si comportano anche da:

4. coattivatori trascrizionali, come KAT4 e KAT12
5. coattivatori dei recettori steroidei, come KAT13A-D.

Le strutture di ciascuna delle tre famiglie di HATs sono state determinate mediante cristallografia a raggi X, che rivela le caratteristiche molecolari dei domini enzimatici (Fig.3).

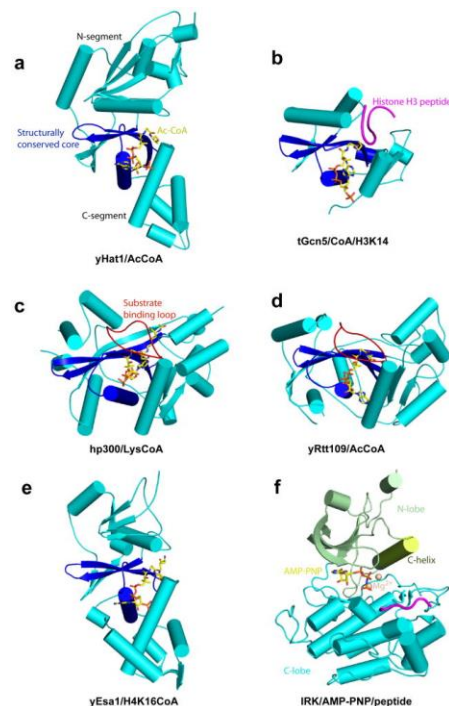


Fig.3 - Struttura delle diverse famiglie di HAT

Rappresentazione della struttura delle 5 famiglie di HAT. La regione centrale, strutturalmente conservata è colorata in blu, le porzioni N- e C-terminali sono colorate in turchese. Il cofattore è indicato in giallo (Yuan and Marmorstein 2013).

Sebbene vi siano differenze nella sequenza, tutte le famiglie di HAT contengono una regione centrale conservata, costituita da un foglietto β a triplo-filamento e una lunga α -elica parallela, che si estende lateralmente al foglietto ed interagisce con l'Ac-CoA. La regione centrale è affiancata da segmenti α/β , strutturalmente diversi in ogni famiglia, che formano una fessura sulla regione centrale, a livello della quale è riconosciuta e legata la lisina (Fig.3) (Yuan and Marmorstein 2013).

Il meccanismo generale con cui le HAT acetilano gli istoni consiste nel trasferimento del gruppo acetile dall'acetil-CoA all'azoto della catena laterale delle lisine istoniche.

L'analisi strutturale, biochimica, mutazionale ed enzimatica di questi enzimi, ha fornito approfondimenti sul loro meccanismo catalitico, rivelando che esso varia notevolmente per ogni famiglia. Nello specifico:

- la famiglia GNAT contiene, a livello del sito attivo, un residuo di glutamato (Glu173 in KAT2A, e Glu570 in KAT2B), altamente conservato, che agisce come base generale, formando un complesso ternario con l'Ac-CoA e la lisina;

- la famiglia MYST sfrutta, invece, un meccanismo a ping-pong, che coinvolge due residui conservati, uno di glutammato (Glu338) e uno di cisteina (Cys304). In questo meccanismo l'enzima prima forma un intermedio acetilato con Cys304 e in seguito trasferisce il gruppo acetile al substrato mediante Glu338 che agisce come base generale (Yan, Harper et al. 2002).

Rispetto alle altre due famiglie, le HAT della famiglia CPB non utilizzano il glutammato. Queste, infatti, sfruttano un meccanismo denominato "*hit-and-run*", in cui giocano un ruolo chiave due residui altamente conservati, uno di tirosina e uno di triptofano. In particolare la Tyr1467 agisce come acido generale e il Trp1436 si occupa di orientare la lisina nel sito attivo (Liu, Wang et al. 2008).

Gli enzimi HAT hanno diverse specificità di substrato per le proteine istoniche o non istoniche.

Ad esempio, KAT3A e KAT3B acetilano tutti e quattro i sottotipi di istone (istone H2A, H2B, H3 e H4), invece KAT6A è in grado di acetilare solo l'istone H3 (Ogryzko, Schiltz et al. 1996, Wang, Faiola et al. 2008), e KAT8 acetila specificamente la lisina 16 a livello dell'istone H4 (H4K16) (Smith, Pannuti et al. 2000).

Questa specificità di substrato è modulata dall'incorporazione degli enzimi in complessi proteici costituiti da più subunità (Lee and Workman 2007). Infatti, KAT8 opera attraverso due complessi proteici conservati, il complesso MSL-1 e il complesso MSL1v1. L'attività di acetilazione di questi due complessi proteici sull'istone H4 è identica, ma quella sul target non-istonico p53 differisce notevolmente (Li, Wu et al. 2009). Inoltre, è stato dimostrato che KAT8 ricombinante, che non è in grado di interagire con questi complessi proteici, acetila sia H2A, che H3 e H4, corroborando il fatto che è proprio l'interazione dell'enzima con i complessi proteici a regolare la specificità di substrato (Smith, Cayrou et al. 2005). Anche nel caso di KAT2A, l'incorporazione nei suoi complessi proteici SAGA e Ada influenza la specificità e l'attività catalitica diretta verso i suoi bersagli molecolari (Grant, Eberharter et al. 1999).

Tabella 1 – Classificazione delle HATs

Canonical members of KAT	Former name in human	Histone protein acetylated	Mechanism of catalysis
P300/CBP family			
<i>KAT3</i>			Hit-and-run
KAT3A	CBP	H2A, H2B,H3,H4	
KAT3B	P300	H2A, H2B,H3,H4	
GCN5 family			
<i>KAT2</i>			KAT/Ac-CoA/substrate ternary complex
KAT2A	GCN5	H3, H4,H2B	
KAT2B	PCAF	H3	
MYST family			
<i>KAT5</i>	Tip60	H4, H2AZ, H2AX	Ping-pong mechanism or ternary mechanism
<i>KAT6</i>			
KAT6A	MOZ/MYST3	H3	
KAT6B	MORF/MYST4		
KAT7	HBO1/MYST2	H4	
KAT8	MOF/MYST1	H4K16	
Transcription co-activators			
KAT4	TAF1, TBP		
KAT12	TIFIIIC90		
Steroid receptor co-activators			
KAT13A	SRC1		
KAT13B	SCR3, AIB1, ACTR		
KAT13C	p600		
KAT13D	CLOCK		

2.1.2.2.1. CBP e p300

Ai fini del nostro studio, ci siamo focalizzati principalmente su p300 e CBP a causa del loro ruolo nella memoria (Alarcon 2004, Levenson and Sweatt 2005, Maurice, Duclot et al. 2008, Caccamo, Maldonado et al. 2010).

CBP e p300 sono proteine modulari che contengono diversi domini ben definiti (CH1, KIX, CH3, ZZ-TAZ2 e NCBD) attraverso cui interagiscono con numerosi fattori di trascrizione e altri coattivatori (Goodman and Smolik 2000).

Lunghe catene di residui intrinsecamente disordinati collegano questi domini al nucleo catalitico dell'enzima, che comprende un bromodominio, la regione CH2 e il dominio HAT. Tra questi, il dominio HAT è deputato all'acetilazione degli istoni o di altre proteine, mentre il bromodominio riconosce i substrati acetilati (Mujtaba, He et al. 2004, Zeng, Zhang et al. 2008). La regione CH2 contiene un dominio discontinuo, denominato PHD, che è in grado di legare le code non modificate dell'istone H3, l'istone H3 trimetilato a livello della Lys4 (H3K4me3), e altra cromatina che ha subito modificazioni epigenetiche (Ragvin, Valvatne et al. 2004, Sanchez and Zhou 2011).

Il bromodominio e la regione CH2 sono entrambi necessari al legame con la cromatina, ma non è ancora chiaro il modo in cui questi domini cooperino nel loro ruolo di 'readers' epigenetici (Tomita, Towatari et al. 2000, Sanchez and Zhou 2011). Essi, inoltre, sembrano essere importanti modulatori dell'attività delle HATs. Infatti, il bromodominio è necessario al dominio HAT per espletare un'efficace acetilazione del substrato e la sua perdita sembra alterare la specificità di substrato e l'attività trascrizionale di p300 (Kraus, Manning et al. 1999, Tomita, Towatari et al. 2000, Manning, Ikehara et al. 2001). Un recente studio sull'analisi strutturale del nucleo di p300, ha rivelato la presenza di un nuovo dominio RING, che non era mai stato

rilevato prima mediante analisi sequenziale dell'enzima. Il dominio RING è localizzato a livello della regione CH2, disposto all'interno del dominio discontinuo PHD (Delvecchio, Gaucher et al. 2013). I domini HAT, PHD, RING insieme al bromodominio formano un complesso in cui il dominio RING, affiancato al sito di binding del substrato (Fig.4), agisce inibendo tale legame mediante ingombro sterico. Infatti, è stato dimostrato che mutazioni a livello del dominio RING portano a una sovraregolazione dell'autoacetilazione dell'enzima stesso e dell'acetilazione del substrato p53 (Delvecchio, Gaucher et al. 2013). Delvecchio et al., hanno quindi proposto un nuovo meccanismo di azione e di regolazione di CBP-p300 in cui l'attivazione dell'enzima richiede lo spostamento del dominio RING in modo da permettere al substrato di accedere al sito attivo, che altrimenti sarebbe parzialmente occluso (Delvecchio, Gaucher et al. 2013).

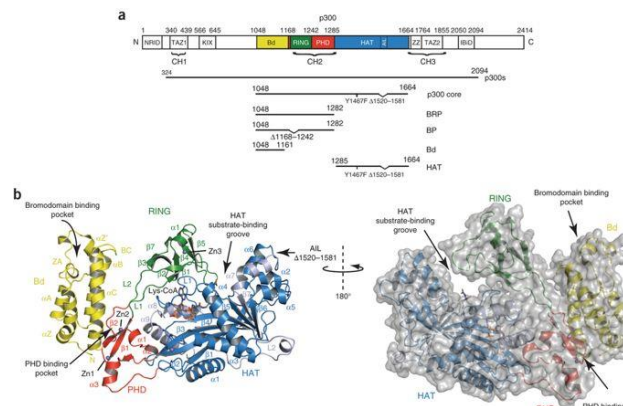


Fig. 4 – Struttura di p300

(a) Sequenza del nucleo di p300. NR1D, dominio di interazione del recettore nucleare; TAZ1, adattatore trascrizionale 1 con struttura a dita di zinco (noto anche come regione 1 (CH1) ricca di cisteina-istidina (CH)); KIX, dominio inducibile dalle chinasi. Regione con cui p300 intergisce e lega in maniera specifica CREB attivandone la trascrizione; Bd, bromodominio; RING, dominio che inibisce il sito attivo mediante ingombro sterico; PHD, *plant homeodomain*; HAT, dominio dell'istone acetiltransferasi; ZZ, dominio del tipo ZZ a dita di zinco; TAZ2, adattatore trascrizionale 2 con struttura a dita di zinco; IBiD, dominio di legame di IRF3 (noto anche come *nuclear coactivator-binding domain* (NCBD)); Il segmento RING-PHD è anche noto come regione CH2 e i domini ZZ-TAZ2 come regione CH3. (b) Rappresentazione cristallografica della struttura del nucleo di p300. Sono indicati gli elementi della struttura secondaria. I bromodomini (Bd), i domini RING e PHD sono indicati rispettivamente in giallo, verde e rosso. I sottodomini N e C del dominio HAT sono indicati in blu e in grigio, rispettivamente. La posizione di delezione di AIL è indicata con una freccia (Delvecchio, Gaucher et al. 2013).

2.1.3. L'acetilazione degli istoni nell'attività neuronale

I meccanismi epigenetici, quali le modificazioni post-traduzionali degli istoni, contribuiscono all'attivazione e al silenziamento della trascrizione genica a livello cerebrale.

Numerosi studi hanno evidenziato che sia la trascrizione che la traduzione genica sono implicate nella formazione della memoria, e in particolare di quella a lungo termine (Barondes and Jarvik 1964, Cohen and Barondes 1966, Flood, Bennett et al. 1975, Flood, Bennett et al. 1975, Squire, Emanuel et al. 1975) un processo complesso che coinvolge molte vie di segnalazione e la regolazione di numerosi geni (Roberson and Sweatt 1999, Selcher, Weeber et al. 2002, Levenson 2004). Inoltre, è stato dimostrato che gli stessi processi che portano alla formazione della memoria comportamentale a lungo termine portano anche alla marcatura epigenetica del genoma (Levenson 2004).

Numerose osservazioni indicano che i meccanismi epigenetici e in particolare l'acetilazione degli istoni, svolgono un ruolo chiave nella memoria e all'apprendimento.

Ad esempio, l'acetilazione dell'istone H3, ma non di quello H4, aumenta significativamente, dopo che l'animale è stato sottoposto a *fear conditioning* (Levenson 2004). Il *contextual fear conditioning* è un modello di apprendimento che dipende dall'ippocampo, mediante il quale un animale impara ad associare un nuovo contesto con uno stimolo avversivo (Phillips and LeDoux 1992, Kim, Rison et al. 1993). Inoltre, la formazione di questo tipo di memoria richiede la trasmissione sinaptica del recettore NMDA (N-metil-D-aspartato) e l'attivazione, a livello ippocampale, della cascata MEK-ERK/MAPK (dove MEK si riferisce alla chinasi MAPK/ERK) (Fanselow, Kim et al. 1994, Atkins, Selcher et al. 1998, Rampon 2000). È stato dimostrato che l'inibizione di uno di questi processi blocca l'incremento dell'acetilazione dell'istone H3 (Levenson 2004).

È interessante notare che, anche un'altra forma di memoria a lungo termine, quale l'inibizione latente, è stata associata ad un'alterata acetilazione dell'istone H4 ma non di quello H3 (Levenson 2004). Questa scoperta indica che potrebbe esserci un codice istonico per la formazione della memoria, per cui specifici tipi di memoria sono associati a specifici schemi di modifica dell'istone (Levenson and Sweatt 2005).

Inoltre, è stato dimostrato che l'aumentata acetilazione degli istoni H3 e H4, indotta dall'arricchimento ambientale induce sinaptogenesi e ripristina i meccanismi di apprendimento e memoria a lungo termine in un modello animale (CK-p25 Tg) che presenta neurodegenerazione e danno cognitivo (Fischer, Sananbenesi et al. 2007).

Come discusso in precedenza, l'aggiunta di gruppi acetilici ai residui lisinici degli istoni è catalizzata dalle HATs.

Tra i principali tipi di HAT, vi sono p300 e la sua omologa proteina legante CREB (CBP). Diversi lavori hanno studiato la formazione della memoria a lungo termine in topi transgenici in cui la funzione di CBP è compromessa. I topi eterozigoti per una forma dominante di CBP troncato (CBPDN +/-) (Oike 1999) hanno presentato significativi deficit in varie forme di memoria a lungo termine, tra cui l'evitamento passivo progressivo (*passive avoidance test*), il riconoscimento di nuovi oggetti (*object recognition test*) e il condizionamento alla paura (*fear conditioning test*) (Oike 1999, Bourchouladze 2003). Sebbene questi studi abbiano fornito la prima evidenza che CBP potesse essere importante nella formazione della memoria, le ampie anomalie dello sviluppo osservate in questi topi hanno reso difficile interpretare le prestazioni di questi animali (Oike 1999). Per ovviare a questo problema, due recenti studi hanno generato due nuovi modelli transgenici con carenza di CBP. Nel primo studio è stato collegato l'allele dominante negativo di CBP a un promotore inducibile (CBPI-DN +/-) (Korzus, Rosenfeld et al.

2004). L'attivazione di questo allele, dopo che gli animali si erano sviluppati normalmente, ha portato alla compromissione dell'apprendimento in due test comportamentali: il Morris water maze e l'Object Recognition test (ORT) (Korzus, Rosenfeld et al. 2004). Nel secondo studio, i topi a cui mancava un allele di CBP (CBP +/-) presentavano un danno a livello della memoria nel *fear conditioning* test e nell'ORT (Alarcon 2004). In entrambi gli studi, la somministrazione di un inibitore HDAC ha ripristinato la normale formazione della memoria a lungo termine, corroborando il fatto che, in questi topi, l'equilibrio dell'attività enzimatica HAT/HDAC è stato alterato provocando l'insorgenza dei deficit cognitivi (Alarcon 2004, Korzus, Rosenfeld et al. 2004).

Numerosi lavori hanno dimostrato come l'aumentata acetilazione degli istoni indotta dalla somministrazione degli inibitori delle HDAC induca un miglioramento delle funzioni cognitive. Nei topi SAMP8, un modello non transgenico di neurodegenerazione, il trattamento con due inibitori HDAC, butirrato di sodio (NaBu) o trichostatina A (TSA), migliora le prestazioni nell'ORT (Rahman, Kukita et al. 2003). Inoltre, il trattamento acuto di TSA nei topi APP/PS1, modello animale di AD, è in grado di migliorare la performance cognitiva e la LTP, mediante la stimolazione dell'acetilazione di H4, che risultava essere ridotta (Francis, Fa et al. 2009).

Da un punto di vista molecolare, l'inibizione delle HDAC aumenta l'espressione di C-FOS e BDNF e stimola l'acetilazione dell'istone H3 a livello dell'ippocampo e della corteccia peririnale (Koppel and Timmusk 2013). L'up-regulation del BDNF è stata descritta avere effetti positivi sulla memoria e sulla vitalità neuronale ed è considerato uno dei possibili meccanismi che stanno alla base degli effetti positivi indotti dall'inibizione delle HDAC (Bredy, Wu et al. 2007).

Il trattamento con SAHA (inibitori delle HDAC di classe I / IIa / IIb) migliora le prestazioni nel test della memoria spaziale e ripristina le alterazioni dell'espressione genica caratteristica dei topi che esprimono la mutazione di APP Swedish e la mutazione PSEN1 L166P (APP^{swe} / PSEN1L166P), senza influenzare la deposizione di A β (Kilgore, Miller et al. 2010). Nello stesso modello, il NaBu è in grado di migliorare la memoria associativa, senza ridurre l'ansia e l'accumulo di A β e tau (Govindarajan, Agis-Balboa et al. 2011). Questi effetti sono stati rilevati in topi di 14 mesi già in uno stadio avanzato della malattia, dimostrando che l'inibizione delle HDAC potrebbe essere efficace anche negli esseri umani, dove l'AD viene solitamente diagnosticata quando i sintomi clinici sono già manifestati.

Un altro inibitore HDAC I / IIa (acido valproico, VPA) migliora la memoria spaziale e di riconoscimento dei topi transgenici APPSWE e APPSWE / PSEN1 Δ E9 (Wang, Zhang et al. 2014). Inoltre, la somministrazione di VPA migliora la memoria nei modelli murini caratterizzati da una progressione della malattia più aggressiva (topi 5xFAD). Questo effetto si verifica però nelle fasi precoci (5 mesi) ma non in quelle tardive della malattia (10 mesi) (Kilgore, Miller et al. 2010). E' stato dimostrato che può essere responsabile degli effetti neuroprotettivi dell'VPA e di altri inibitori delle HDAC (Pan, Li et al. 2005) .

Il fenilbutirrato di sodio (PBA), un altro inibitore ad ampio spettro delle HDAC, già approvato per il trattamento di disordini che coinvolgono il metabolismo dell'urea, migliora le prestazioni cognitive dei modelli murini di AD, aumentando l'espressione dei marker della plasticità sinaptica (GLUR1, PSD95 e MAP2) e riducendo tau iperfosforilata (Ricobaraza, Cuadrado-Tejedor et al. 2009). L'esposizione cronica al PBA ripristina anche la densità delle spine dendritiche, promuove la clearance di A β e riduce l'espressione dei geni associati allo stress intracellulare a causa del misfolding della proteina (Wiley, Meabon et al. 2010).

E' interessante notare che i dati provenienti dalle linee cellulari di neuroblastoma suggeriscono che HDAC1 svolge un ruolo fondamentale nel controllo della clearance di A β , reprimendo l'espressione della proteasi neprilisina (NEP), che è necessaria alla degradazione del peptide. Il trattamento con tricostatina A (TSA) o VA aumenta l'espressione di questa proteina nelle linee cellulari di neuroblastoma umano (Wang, Zhang et al. 2014). Inoltre, HDAC1 svolge un importante ruolo nella regolazione del ciclo cellulare, nel mantenimento dell'integrità del DNA e nella sopravvivenza dei neuroni adulti. Quindi la deregolamentazione di questo enzima può portare a un'espressione aberrante di geni del ciclo cellulare, danni al DNA e, infine, morte nei neuroni adulti (Kim, Frank et al. 2008). Tuttavia, Sebbene HDAC1 svolga un importante ruolo nella neuroprotezione, essa non sembra essere coinvolta nelle funzioni cognitive (Guan, Haggarty et al. 2009).

Il ruolo di HDAC1 nella funzione cognitiva è in netto contrasto con quello di HDAC2. Infatti, è stato dimostrato come HDAC2 inibisca la sinaptogenesi, sopprima l'espressione genica a livello neuronale e determini la compromissione della plasticità sinaptica, alterando i processi della formazione della memoria (Guan, Haggarty et al. 2009). Modelli animali che overesprimono HDAC1 nei neuroni del prosencefalo non hanno mostrato differenze nel fenotipo cognitivo, al contrario l'overespressione di HDAC2 ha provocato un notevole indebolimento della memoria e la compromissione della plasticità sinaptica (Guan, Haggarty et al. 2009). Questi topi inoltre, mostrano una ridotta acetilazione a livello di H4K12, ma non di H3K14, a livello ippocampale. Al contrario, topi KO per HDAC2 rivelano un'aumentata acetilazione dello stesso sito lisinico, oltre ad un miglioramento dei processi cognitivi e della plasticità sinaptica (Guan, Haggarty et al. 2009). Nei topi anziani (Peleg, Sananbenesi et al. 2010), la disregolazione dell'acetilazione a livello del sito H4K12 nell'ippocampo, è causalmente implicata nella compromissione della

memoria associata all'età e l'HDAC2 (ma non l'HDAC1) sembra svolgere un ruolo importante nella regolazione dell'acetilazione a questo livello.

A sostegno del ruolo di HDAC2 nella memoria, è stato inoltre dimostrato che la somministrazione di SAHA in topi che overesprimono HDAC2 migliora la plasticità sinaptica e la memoria, dove nei topi KO per HDAC2 non ha alcun effetto (Guan, Haggarty et al. 2009).

Infine, è interessante notare che studi recenti hanno dimostrato che la deregolazione dei meccanismi epigenetici possono portare all'interruzione dell'espressione genica associata alla memoria e alla plasticità sinaptica (Levenson and Sweatt 2005). A sostegno di questa ipotesi infatti, è stato evidenziato che l'induzione della fase iniziale della LTP, che è una forma di plasticità che non richiede la trascrizione genica, non è stata alterata negli animali CBP +/- . Al contrario, l'induzione della fase tardiva della LTP, che invece richiede la trascrizione, è stata compromessa significativamente. Il trattamento delle fettine di ippocampo ottenute da questi animali con un inibitore HDAC ha migliorato significativamente l'induzione della fase tardiva dell'LTP, indicando che l'inibizione delle HDAC ha compensato l'aploinsufficienza delle HAT (Alarcon 2004).

Gli inibitori delle HDAC rappresentano un nuovo approccio terapeutico per il trattamento dell'AD, e sembrano rendere la sinapsi più solida e resistente agli effetti di A β . Sulla base di numerose evidenze, sembrerebbe che HDAC2 rappresenti il target principale (se non l'unico) degli inibitori delle HDAC, responsabile del miglioramento della memoria (Fischer, Sananbenesi et al. 2010). Tuttavia, gli inibitori delle HDAC di prima generazione, che hanno raggiunto le fasi cliniche, sono molecole a bassa specificità, che presentano notevoli effetti collaterali causati dalla loro interazione con più di una classe di HDAC [144,145]. Infatti, le HDAC presentano una

struttura molto s mile, in particolare a livello del dominio a dita di zinco, che rende difficile la sintesi di farmaci selettivi per specifiche isoforme.

Questa limitazione ha spinto le industrie farmaceutiche ad identificare composti pi  selettivi o approcci alternativi come gli attivatori delle HAT.

2.2. Scopo della Ricerca

**Caratterizzazione di nuovi HAT attivatori
per la terapia della malattia di Alzheimer**

Studi recenti condotti nel laboratorio del Prof. Arancio hanno dimostrato che A β riduce l'acetilazione di specifiche lisine istoniche, un'importante modifica post-trasduzionale che svolge un ruolo chiave nei processi di formazione della memoria. Inoltre l'acetilazione di questi residui è ridotta nei pazienti AD.

In particolare, A β interferisce con la trascrizione di CREB, (cAMP Response Element Binding protein), un fattore di trascrizione cellulare cAMP dipendente, che svolge un ruolo diretto nella plasticità sinaptica e nei processi cognitivi, inibendone la fosforilazione durante l'LTP (Silva, Kogan et al. 1998, Lonze and Ginty 2002, Carlezon, Duman et al. 2005).

La fosforilazione di CREB (pCREB) é un fenomeno necessario al cofattore stesso per legarsi a CBP, un'acetil transferasi istonica (HAT), che induce l'acetilazione degli istoni, stimolando in tal modo la sintesi di proteine essenziali all'induzione e al mantenimento di tali processi.

In questo contesto, numerosi lavori dimostrano che la soppressione delle HATs in modelli murini determina un deterioramento della performance cognitiva (Korzus, Rosenfeld et al. 2004, Oliveira, Wood et al. 2007, Maurice, Duclot et al. 2008) e che i livelli di questi enzimi (Bousiges, Vasconcelos et al. 2010) e dell'acetilazione degli istoni H2A, H2B, H3 e H4 (Graff and Mansuy 2008, Roth and Sweatt 2009, Bousiges, Vasconcelos et al. 2010, Valor, Pulopulos et al. 2011) risultano aumentati durante l'elaborazione della memoria.

Inoltre é interessante notare che gli inibitori delle HDAC (HDACI) migliorano l'LTP e la memoria (Levenson 2004, Fischer, Sananbenesi et al. 2007, Kim, Nguyen et al. 2007, Graff, Rei et al. 2012), in particolare tra questi, la Tricostatina A (TSA), stimola l'LTP e la performance cognitiva nei topi APP/PS1, un modello di overproduzione di A β (Francis, Fa et al. 2009).

Sulla base di queste evidenze, strategie farmacologiche in grado di stimolare l'acetilazione degli istoni possono rappresentare un approccio terapeutico efficace nella malattia di Alzheimer.

La strategia più comunemente utilizzata per up-regolare l'acetilazione dell'istone è l'utilizzo di HDACI. Tuttavia, l'uso di queste molecole si è però rivelato difficile dal punto di vista farmacologico a causa della difficoltà a sviluppare delle molecole selettive per HDAC2, una deacetilasi che svolge un ruolo chiave nei processi di formazione della memoria (Guan, Haggarty et al. 2009).

In questo lavoro invece, il gruppo del Prof. O. Arancio si è concentrato su un approccio alternativo, avendo come obiettivo quello di stimolare l'attivazione delle HATs e a tal fine è stato sintetizzato un nuovo attivatore delle HAT, YF2 (PCT / US2010 / 59925, 12/10/10).

Innanzitutto è stato dimostrato, attraverso un saggio di acetilazione, che YF2 è un potente attivatore delle tre HATs coinvolte nella memoria, ovvero p300, CBP e PCAF. Inoltre, si è rivelato avere buone caratteristiche farmacocinetiche, una buona permeabilità della barriera ematoencefalica (BBB) e un buon profilo di tossicità.

In seguito, YF2 è stato testato su topi adulti per valutare la capacità di acetilazione degli istoni coinvolti nei processi di apprendimento e memoria. I risultati hanno dimostrato che la molecola è in grado di acetilare residui lisinici a livello degli istoni H3, H4 e totalmente l'istone H2.

La somministrazione intraperitoneale di YF2 ha migliorato trasmissione sinaptica e memoria sia in topi WT trattati con A β che in topi transgenici APP/PS1.

Tuttavia, le proprietà chimico-fisiche di YF2 non si sono rivelate ottimali, in particolare il composto ha una scarsa solubilità e un cLogP elevato (5.16); un LogP>0 identifica un composto con elevato carattere idrofobo e che quindi si distribuisce preferenzialmente all'interno del doppio strato lipidico delle cellule rispetto al plasma. Quindi, il miglioramento di queste proprietà chimico-fisiche potrebbe migliorare anche le caratteristiche farmacodinamiche. Infatti, il YF2 ha rivelato una scarsa stabilità metabolica, che sembra essere causata dalla dealchilazione

a livello microsomiale del gruppo dietilamminico del sostituito in posizione C2, e dall'ossidazione dell'anello aromatico A da parte degli enzimi P450.

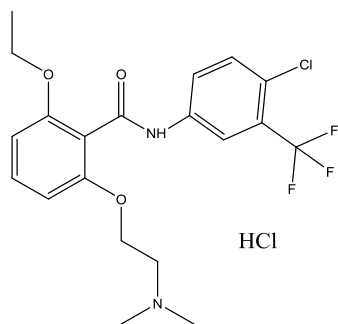
Sulla base di questi risultati, lo scopo del lavoro qui proposto, che ho svolto durante il mio periodo all'estero, è stato quello di identificare nuovi attivatori HAT ad elevata affinità e selettività per CBP/p300 tra quelli disegnati e sintetizzati nei laboratori dei Proff. Arancio e Don Landry della Columbia University e quelli disegnati e sintetizzati da un'azienda privata, (Evotec, Germania), in seguito a modifiche strutturali di YF2 e il disegno di nuove scaffolds.

2.3. Materiali e Metodi

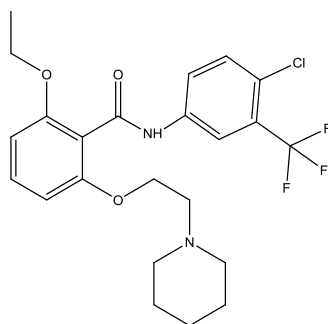
**Caratterizzazione di nuovi HAT attivatori
per la terapia della malattia di Alzheimer**

2.3.1. Composti testati

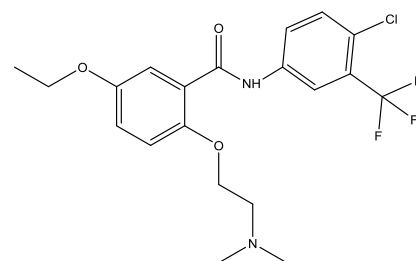
JF1, JF3, JF4, JF5, JF6, JF7, JF9, J10, JF16, RP14, RP23, RP58, e RP59 sono stati disegnati e sintetizzati rispettivamente da Jole Fiorito (JF) e da Rosita Purgatorio (RP) nei laboratori dei Proff. Arancio e Landry della Columbia University.



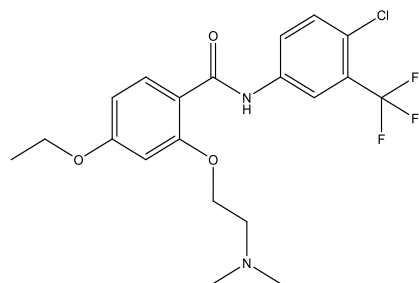
YF2-HCl



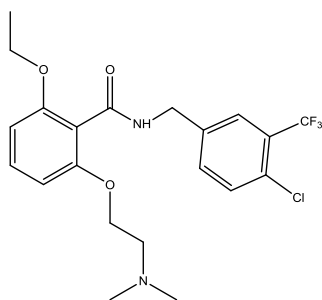
JF1



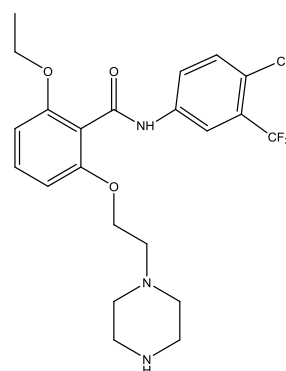
JF3



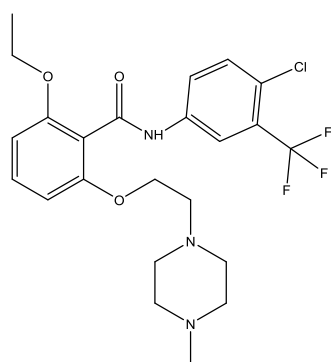
JF4



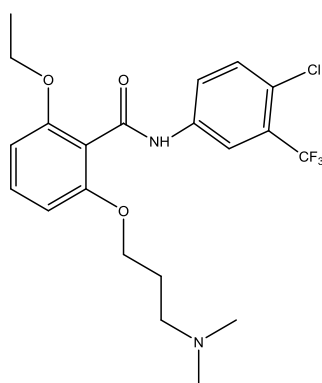
JF5



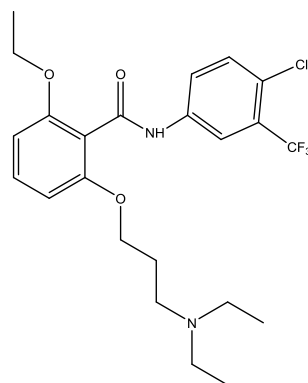
JF6



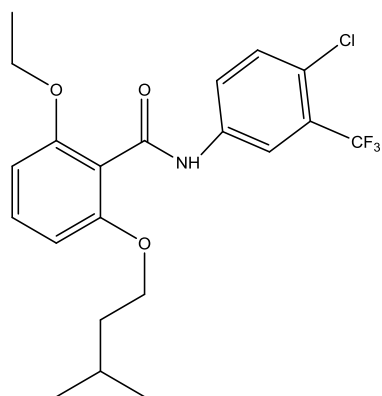
JF7



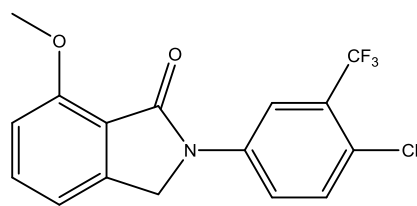
JF9



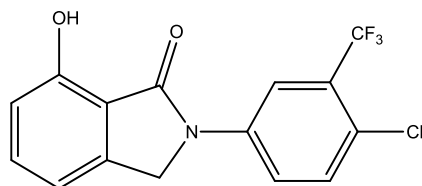
JF10



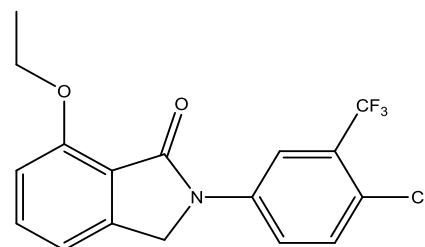
JF16



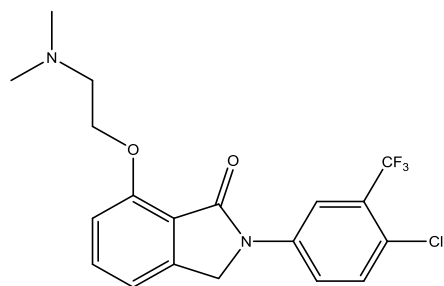
RP14



RP23

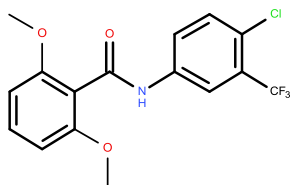


RP58

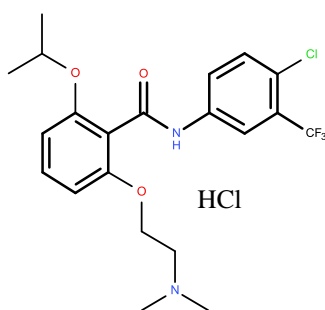


RP59

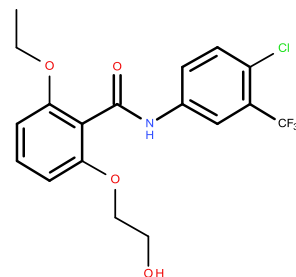
RA010115, RA010143, RA010146, RA010165, RA010168, RA010171, RA010900, RA013886 sono stati disegnati e sintetizzati presso una CRO company, Evotec (Germania).



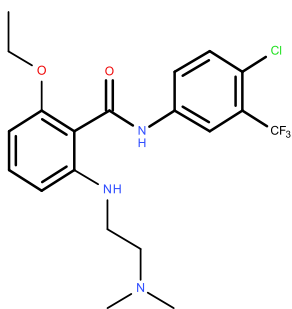
RA010115



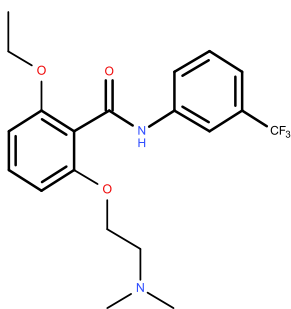
RA010143



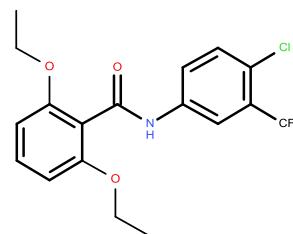
RA010146



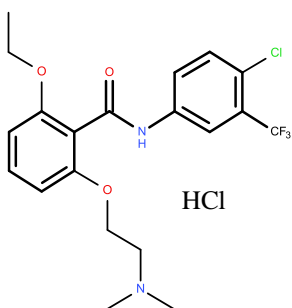
RA010165



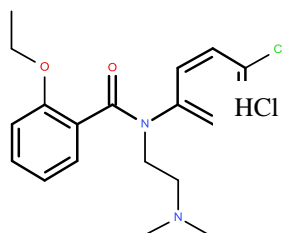
RA010168



RA010171



RA010900



RA013883

2.3.2. Saggi dell'attività istone-acetilasi (H3) di p300 a livello della Lys18 (K18) e della Lys27 (K27)

2.3.2.1. Enzimi e substrati

Il saggio di acetilazione prevede l'utilizzo: dell'enzima HAT p300 full length umana alla concentrazione finale di 2 ng/μl (Active Motif, Carlsbad, CA); dell'istone H3.3 umano alla concentrazione finale di 50 ng/μl (New England Biolabs, Ipswich, MA); dell' Acetil coenzima A (Ac-CoA; Sigma Aldrich, Saint Louis, MI), la cui concentrazione è stata ottimizzata in base alle condizioni sperimentali ed è pari a 0.5 μM.

2.3.2.2. Condizioni sperimentali

Per ogni composto, è stata preparata una soluzione di stock a una concentrazione finale di 10 mM (10000 μM), sciogliendo la polvere in DMSO o H₂O. A partire da questa soluzione è stata effettuata una serie di diluizioni intermedie, al fine di ottenere tali concentrazioni: 1000, 100, 50, 10, 1, 0.1, 0.001 μM, e una soluzione di solo DMSO che nei nostri saggi equivale allo 0. Queste soluzioni sono poi state diluite dieci volte in *5X HAT assay buffer* (con la seguente composizione: 250 mM Tris-HCl, pH 7.9; 5 mM DTT; 50 mM butirrato di sodio), al fine di ottenere tali concentrazioni in 10% di DMSO: 100000, 10000, 1000, 500, 100, 10, 1, 0.01, 0 nM. 2 μl di ognuna delle soluzioni ottenute sono stati aggiunti a una reazione di 20 μl finali in modo che la concentrazione finale di DMSO fosse dell'1% in tutti le reazioni. In questo passaggio è stata preparata una soluzione contenente solo *5X HAT assay buffer* indicata come "bianco".

Inizialmente le reazioni enzimatiche sono state condotte a 30° C per 30 minuti in una miscela contenente: 4 μl di *5X HAT assay buffer*, 2 μl di p300 (20 ng/μl) e 2 μl del composto da testare. Al termine dei 30 minuti è stata aggiunta un'altra miscela contenente Ac-CoA (10 μM) e il substrato H3.3 (1 μg/μl). Le reazioni enzimatiche sono state condotte a 30° C per un'ulteriore ora.

Al termine dell'incubazione con il substrato, i campioni sono stati sottoposti a SDS-PAGE ed immunoblot.

2.3.2.3 SDS-PAGE ed immunoblot

I campioni in oggetto di studio, derivati dal saggio di acetilazione precedentemente descritto, sono stati sottoposti ad SDS-PAGE ed immunoblot essenzialmente come riportato nella prima parte di questa tesi (vedi pag.60), con minime modifiche. In particolare, al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite dal gel alla membrana di PVDF utilizzando il sistema *semi-dry* Trans-Blot® Turbo™ Blotting System (Bio-Rad). Il buffer freddo di trasferimento contiene 20% di Trans-Blot® Turbo™ Transfer Buffer (Bio-Rad) e 20% etanolo. Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di PVDF avviene applicando una corrente costante di 1.3 A, e un voltaggio variabile fino a 25 V, per 7 minuti.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- anti-p300 umana (1:1000; Santa Cruz, Dallas, TX)
- anti-H3 (1:5000; Cell Signaling, Danvers, MA)
- anti-acetyl H3 (Lys27) (1:2000; Cell Signaling, Danvers, MA)
- anti-acetyl H3 (Lys18) (1:2000; Cell Signaling, Danvers, MA).

Al termine delle incubazioni con l'anticorpo primario, le membrane sono state lavate 3 volte, per 10 minuti, in t/TBS e incubate con un anticorpo secondario (anti-mouse o anti-rabbit) diretto contro l'anticorpo primario e coniugato ad una perossidasi di rafano (HRP) (Cell Signaling, Danvers, MA). Le proteine sono state rilevate in chemiluminescenza, utilizzando il kit ECL SuperSignal™ West Dura (Thermo Fisher) ed acquisendo il segnale mediante ChemiDoc

Odyssey Fc Imager (LI-COR Bioscience). La quantificazione delle bande è stata eseguita attraverso il software Image Studio Lite (LI-COR Bioscience).

2.3.2.5 Analisi dei dati

I saggi dell'attività di p300 sono stati eseguiti in triplicato per ogni concentrazione, ad eccezione di YF2 per cui sono stati eseguiti 6 esperimenti.

I dati di densitometria delle bande del Western Blot sono state analizzate utilizzando il software Graphpad Prism. Sulla base del tipo di attività enzimatica, i dati di quantificazione sono stati normalizzati nel modo seguente:

ATTIVATORI: Il segnale (Y_0) in assenza del composto in ciascun set di dati è stata definita come attività minima pari allo 0%. Il valore del segnale massimo (Y_{\max}) in ciascun set di dati è stato definito come attività massima, del 100%. L'attività percentuale in presenza del composto è stata calcolata in base alla seguente equazione: $\% \text{ activity} = (Y - Y_0) / (Y_{\max} - Y_0) \times 100\%$, dove Y = segnale in presenza del composto. I valori di attività % rispetto a una serie di concentrazioni di composti sono stati quindi tracciati utilizzando l'analisi di regressione non lineare della curva dose-risposta sigmoidale generata con l'equazione $Y = B + (T - B) / 1 + 10^{((\log EC_{50} - X) \times \text{pendenza della curva})}$, dove Y = percentuale di attività, B = attività percentuale minima, T = attività percentuale massima, X = logaritmo del composto, pendenza della curva = fattore di pendenza o coefficiente della curva.

INIBITORI: Il valore del segnale minimo (Y_{\min}) in ciascun set di dati è stato definito come attività minima pari allo 0%. Il segnale (Y_0) in assenza del composto in ciascun set di dati è stata definita come attività massima, pari al 100%. L'attività percentuale in presenza del composto è stata calcolata in base alla seguente equazione: $\% \text{ activity} = (Y - Y_{\min}) / (Y_0 - Y_{\min}) \times 100\%$, dove Y = segnale in presenza del composto. I valori di attività % rispetto a una serie di

concentrazioni di composti sono stati quindi tracciati utilizzando l'analisi di regressione non lineare della curva dose-risposta sigmoidale generata con l'equazione $Y = B + (T - B) / 1 + 10^{((\log IC_{50} - X) \times \text{pendenza della curva})}$, dove Y = percentuale di attività, B = attività percentuale minima, T = attività percentuale massima, X = logaritmo del composto, pendenza della curva = fattore di pendenza o coefficiente della curva..

Il valore EC₅₀ è la concentrazione che induce l'aumento del 50% dell'attività massima dell'enzima. Il valore IC₅₀ è la concentrazione che induce un'inibizione del 50% dell'attività massima dell'enzima.

Gli errori standard sono stati calcolati utilizzando la seguente equazione:

$$SE = IC_{50}(\text{media}) - IC_{50}(\text{low}) * (SE(\text{LogEC}_{50}) / (\text{LogEC}_{50}(\text{media}) - \text{LogEC}_{50}(\text{low})))$$

2.4. Risultati

**Caratterizzazione di nuovi HAT attivatori
per la terapia della malattia di Alzheimer**

2.4.1. Effetto dei singoli composti sull'attività enzimatica di p300

2.4.1.1. YF2

Numerosi studi effettuati nel laboratorio del Prof. O. Arancio in collaborazione con la Prof.ssa J. Amengual hanno dimostrato che YF2 è in grado di incrementare l'attività enzimatica di diverse HAT, in particolare di CBP (EC₅₀=4.5 nM), p300 (EC₅₀=4.6 nM), PCAF (EC₅₀=99.3 nM), GCN5 (EC₅₀=357 nM) e Tip60 (EC₅₀>200 µM).

Quindi, al fine di settare le condizioni sperimentali, abbiamo innanzitutto misurato l'attività di YF2 su p300 full lenght. A tale scopo abbiamo effettuato il saggio dell'attività istone-acetilasica (per i dettagli tecnici vedere 3.2. Saggi dell'attività istone-acetilasica (H3)) di p300 a livello della Lys18 (K18) e della Lys27 (K27)), che ci ha permesso di valutare se YF2 aumentava l'acetilazione a livello delle lisine 18 e 27 dell'istone H3. Come mostrato in Fig. 1, YF2 aumenta l'acetilazione dell'istone H3 a livello di entrambe le lisine, in maniera concentrazione dipendente.

Dopo aver confermato l'attendibilità del metodo su YF2, abbiamo effettuato lo stesso saggio su ciascuno dei nostri composti, al fine di trovare altri HAT attivatori.

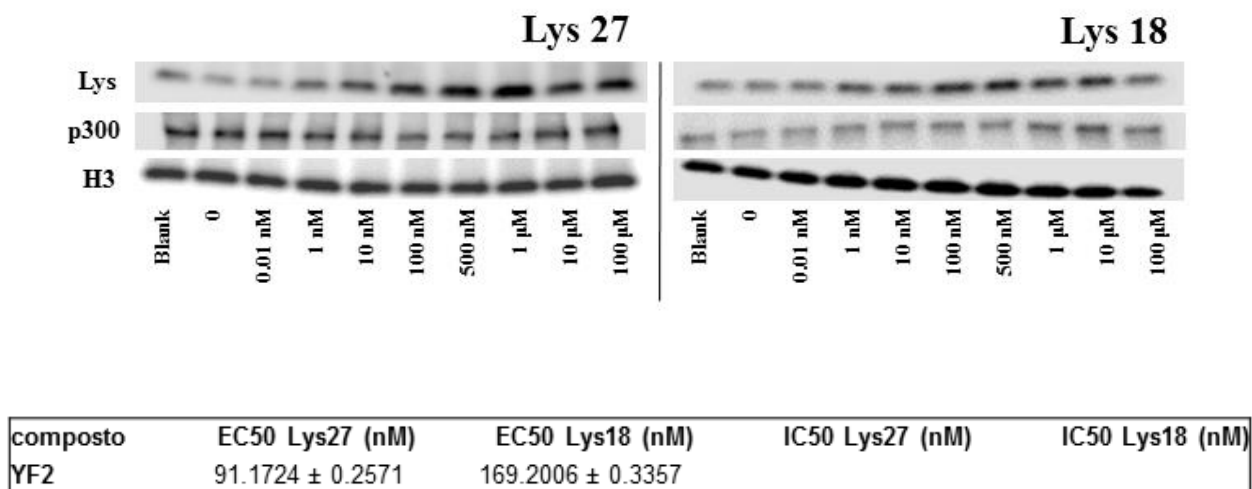


Fig. 1 – YF2 aumenta l’acetilazione dell’istone H3 a livello della Lys 18 e 27

YF2 aumenta l’acetilazione dell’istone H3 a livello dei siti H3K27 e H3K18. La soluzione di stock è stata preparata in DMSO a una concentrazione di 10 Mm. In seguito è stata effettuata una serie di diluizioni per ottenere la seguente curva di concentrazioni: 1000, 100, 50, 10, 1, 0.1, 0.001 μM. Queste sono state diluite 10 volte in 5X HAT assay buffer e nuovamente 10 volte nella reazione finale fino ad ottenere le concentrazioni indicate (DMSO=1%). Le reazioni sono state incubate a 30° C per mezz’ora in presenza del composto e dell’enzima p300. In seguito all’aggiunta del substrato H3.3 e del coenzima Ac-CoA, esse sono state condotte per un’ora a 30° C. Al termine del periodo di incubazione, le proteine sono state processate e sottoposte a SDS-PAGE, seguita da un’analisi in immunoblot con gli anticorpi anti-AcH3K27, anti-AcH3K18 e anti-p300 full lenght. Il segnale di H3 totale rappresenta il controllo interno della quantità di campione caricata. I dati, normalizzati per i valori densitometrici di H3, sono rappresentati come medie ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. Il calcolo dell’EC50 è stata eseguita mediante l’analisi di regressione non lineare della curva dose-risposta sigmoideale generata con l’equazione $Y = B + (TB) / 1 + 10 ((\text{LogEC50/IC50-X}) \times \text{Pendenza della curva})$, dove Y = attività percentuale media, B = attività percentuale minima, T = attività percentuale massima, X = logaritmo del composto e pendenza della curva = fattore di pendenza o coefficiente della curva.

2.4.1.2. HAT attivatori a livello di entrambi i siti lisinici di H3: RA010115, RA010171, RA010900 attivano l’acetilazione di H3K18 e H3K27

Tra i composti testati , quelli piú promettenti che sono in grado di attivare l’acetilazione dell’istone H3 su entrambi i siti lisinici sono: RA010115, RA010171, RA0101900 (Fig. 2).

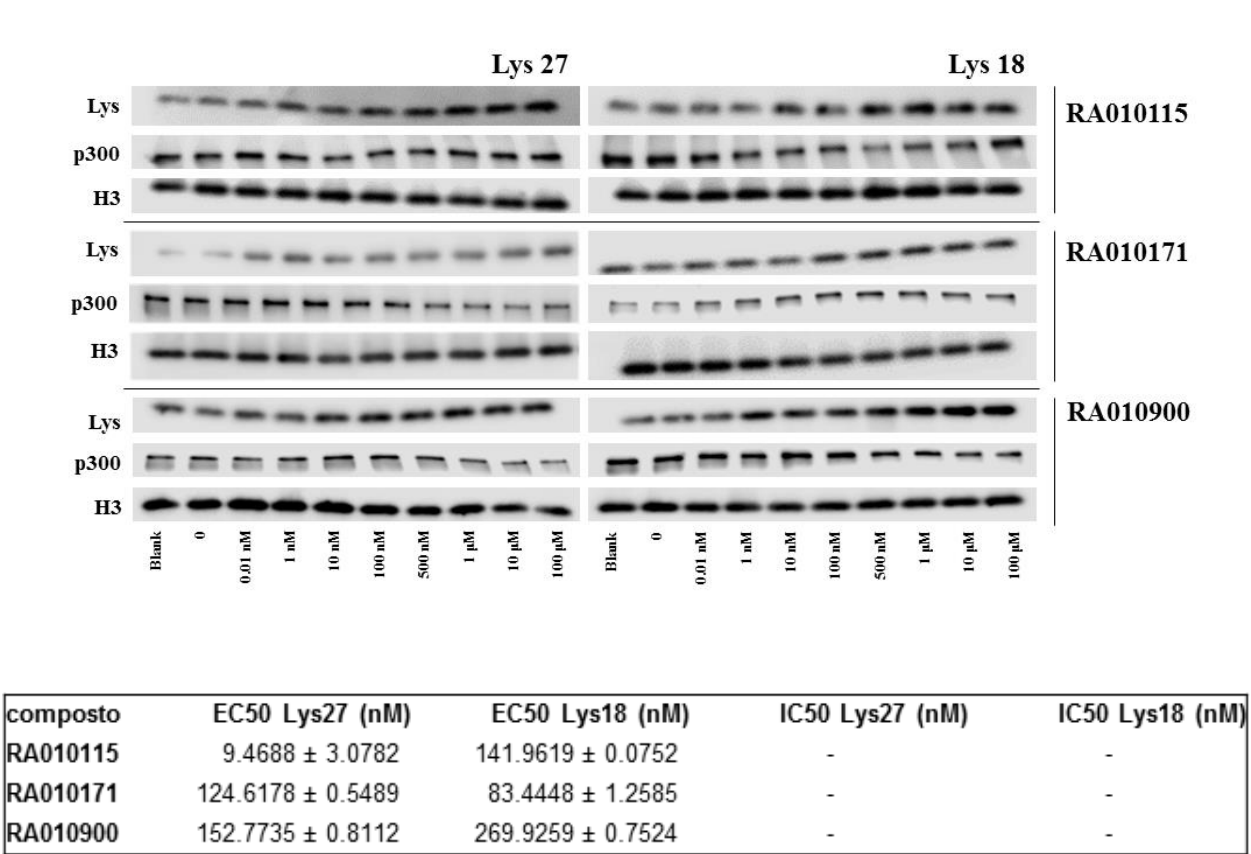


Fig. 2 – RA010115, RA010171, RA010900 attivano l’acetilazione dell’istone H3 a livello della Lys 18 e della Lys 27

2.4.1.3. HAT attivatori a livello di uno dei due siti lisinici di H3: JF9 attiva l’acetilazione della Lys18 (H3K18), RP23 attiva l’acetilazione della Lys27 (H3K27)

Il saggio di acetilazione ha dimostrato che due dei composti testati, ossia JF9 e RP23 si comportano da HAT attivatori per un solo sito lisinico. In particolare JF9 aumenta l’acetilazione del sito H3K18 (Fig. 3) e RP23 quella del sito H3K27, sebbene quest’ultimo dia una blanda attivazione (Fig. 4).

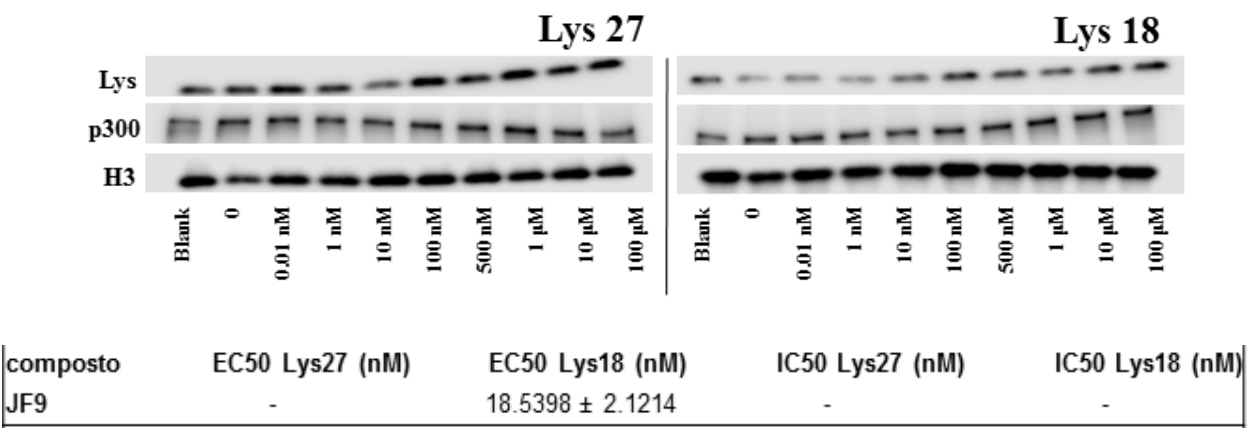


Fig. 3 – JF9 aumenta l’acetilazione dell’istone H3 a livello della Lys 18 ma non della Lys 27

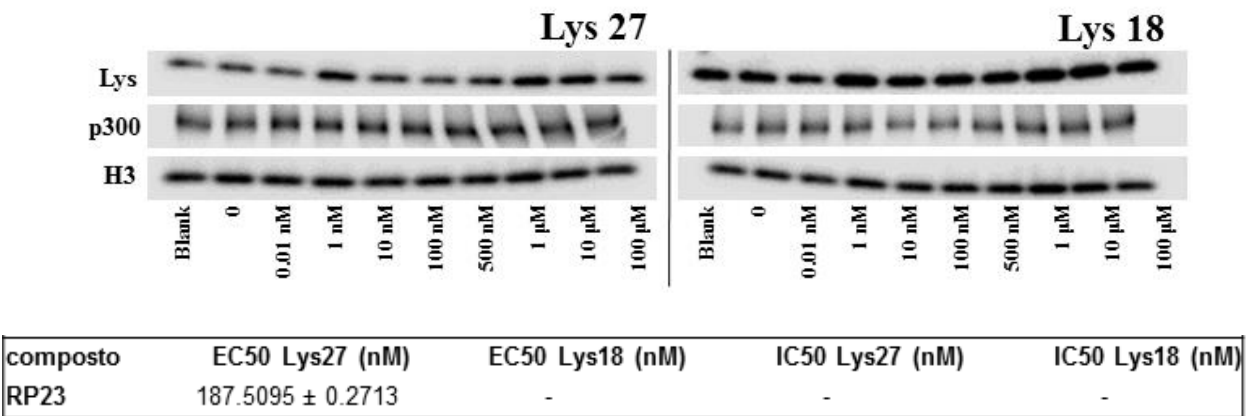


Fig. 4 – RP23 aumenta l’acetilazione dell’istone H3 a livello della Lys 18 ma non della Lys 27

2.4.1.4. HAT inibitori a livello di entrambi i siti lisinici di H3: JF1, JF5, JF7, JF10 inibiscono l’acetilazione a livello dei siti H3K18 e H3K27

Il saggio di acetilazione ha dimostrato che invece i composti JF1, JF5, JF7 e JF10 si comportano da HAT inibitori di entrambi i siti H3K18 e H3K27 (Fig.5).

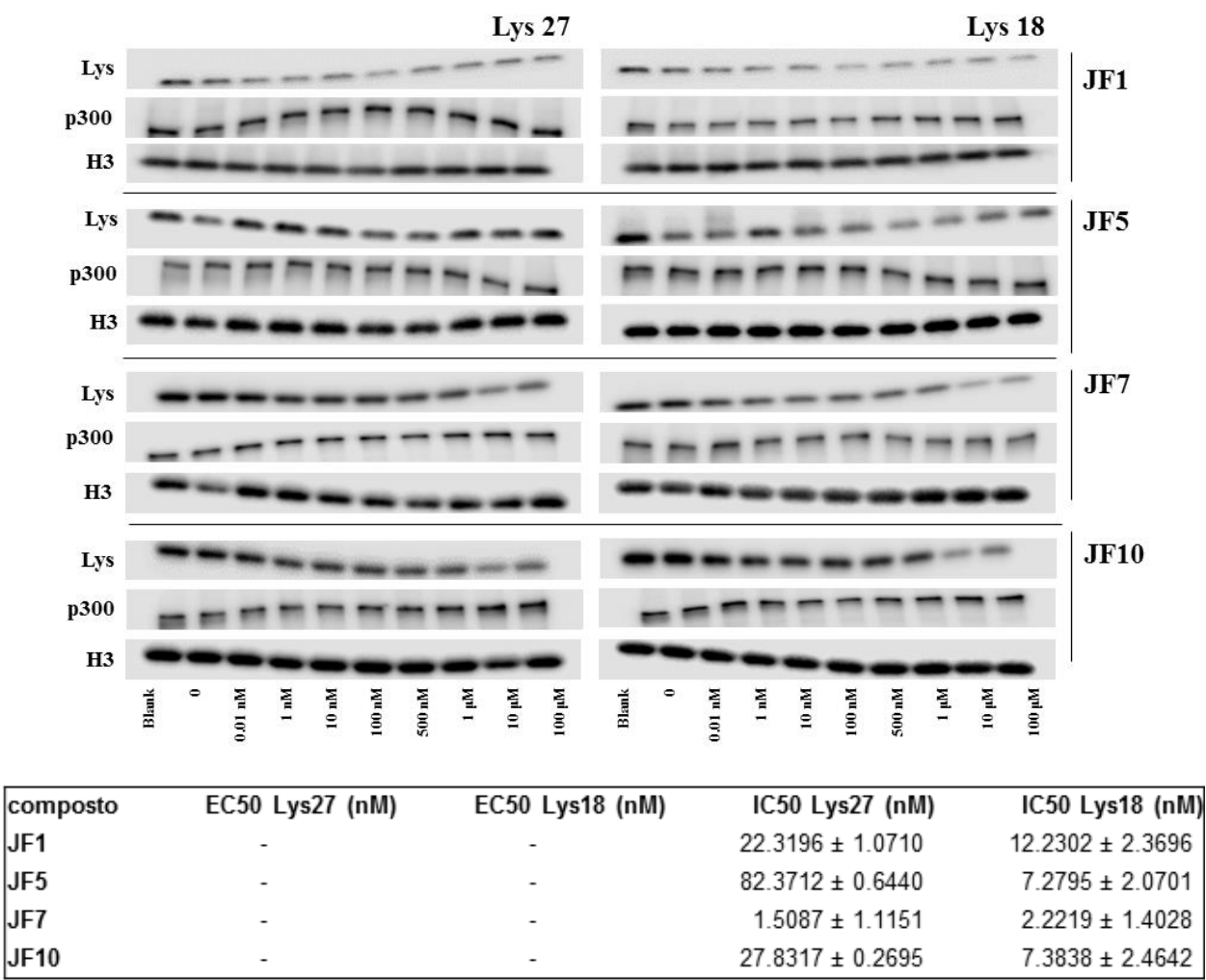


Fig. 5 – JF1, JF5, JF7, JF10 inibiscono l’acetilazione dell’istone H3 a livello della Lys 27 e Lys18

2.4.1.5. HAT inibitori a livello di uno dei due siti lisinici di H3: JF3 e JF16 inibiscono l’acetilazione del sito H3K18, JF6 e RP14 inibiscono l’acetilazione del sito H3K27

JF3, JF6, JF16 e RP14 si comportano da HAT inibitori per un solo sito lisinico. In particolare JF3 e JF16 inibiscono l’acetilazione del sito H3K18 (Fig.6); JF6 e RP14 inibiscono invece l’acetilazione del sito H3K27 (Fig.7).

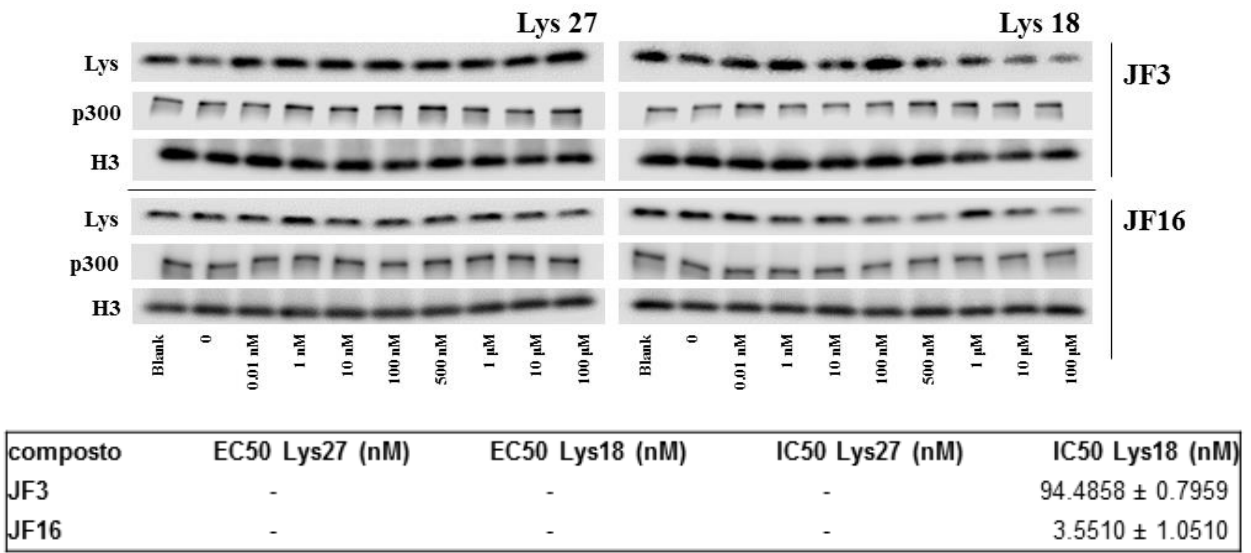


Fig. 6 – JF3 e JF16 inibiscono l’acetilazione dell’istone H3 a livello della Lys 18

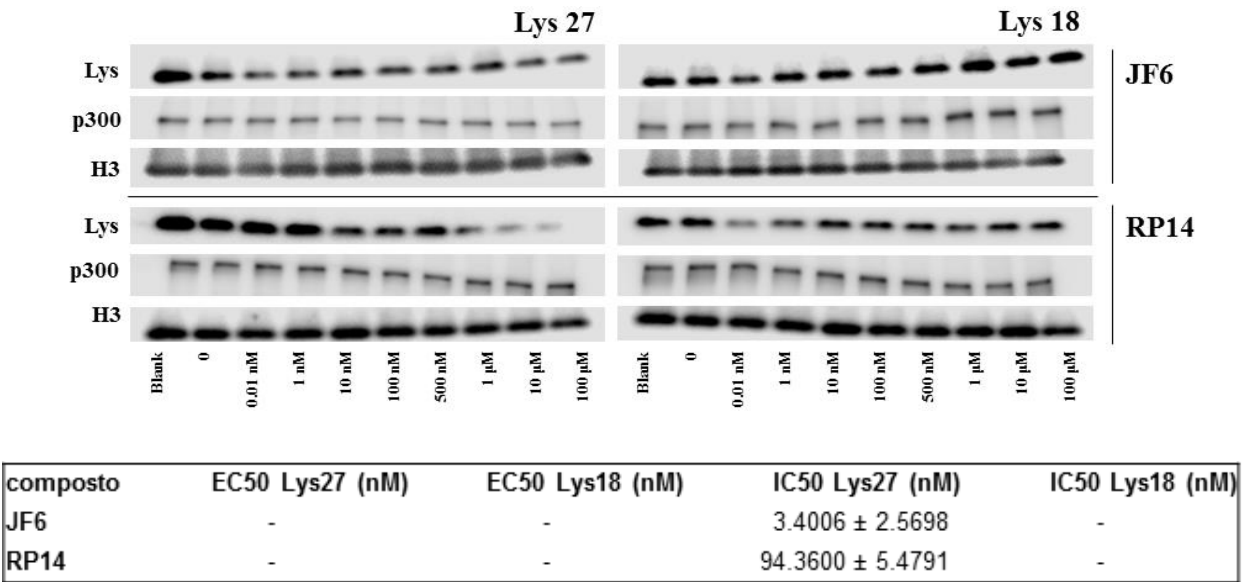


Fig. 7 – JF6 e RP14 inibiscono l’acetilazione dell’istone H3 a livello della Lys 27

2.4.1.6. JF4, RP58, RP59, RA010143, RA010146, RA010165, RA010168 e RA013886 non hanno alcuna attività

Tra i composti testati, quelli rimanenti, ossia JF4, RP58, RP59, RA010143, RA010146, RA010165, RA010168 e RA013886 non hanno mostrato alcuna attività a livello di p300 (Fig. 8).

2.4.2. Effetto dei composti sull'attività enzimatica di p300

L'effetto dei composti sull'attività enzimatica di p300 sono riassunti in Tabella 1.1.

Tabella 1.1.

COMPOSTO	EFFETTO
YF2 HCl in DMSO	attivatore dell'acetilazione K18/27
JF1 in DMSO	inibitore dell'acetilazione K18/27
JF3 in DMSO	inibitore dell'acetilazione K18
JF4 in DMSO	nessuna attività
JF5 in DMSO	inibitore dell'acetilazione K18/K27
JF6 in DMSO	inibitore dell'acetilazione K27
JF7 in DMSO	inibitore dell'acetilazione K18/K27
JF9 in DMSO	attivatore dell'acetilazione K27
JF10 in DMSO	inibitore dell'acetilazione K18/K27
JF16 in DMSO	inibitore dell'acetilazione K18
RP14 in DMSO	inibitore dell'acetilazione K27
RP23 IN DMSO	attivatore dell'acetilazione K18
RP58 in DMSO	nessuna attività
RP59 in DMSO	nessuna attività
RA010115 in DMSO	attivatore dell'acetilazione K18/K27
RA010143 HCl in DMSO	nessuna attività
RA010143 HCl in H ₂ O	nessuna attività
RA010146 in DMSO	nessuna attività
RA010165 in DMSO	nessuna attività
RA010168 in DMSO	nessuna attività
RA010171 in DMSO	attivatore dell'acetilazione K18/K27
RA010900 HCl in DMSO	nessuna attività
RA010900 HCl in H ₂ O	attivatore dell'acetilazione K18/K27
RA013886 in DMSO	nessuna attività

Le EC50/IC50 dei composti nei confronti di p300 sono riassunte nella Tabella 1.2.

Tabella 1.2.

COMPOSTO	Lys 27 (EC50)	Lys 18 (EC50)	Lys 27 (IC50)	Lys 18 (IC50)
YF2 HCl in DMSO	91.17 nM	169.2 nM	-	-
JF1 in DMSO	-	-	22.32 nM	12.23
JF3 in DMSO	-	-	-	7.303 nM
JF4 in DMSO	-	-	-	-
JF5 in DMSO	-	-	82.37 nM	7.28 nM
JF6 in DMSO	-	-	0.04563 nM	-
JF7 in DMSO	-	-	1.51 nM	2.22 nM
JF9 in DMSO	-	18.54 nM	-	-
JF10 in DMSO	-	-	27.83 nM	7.38 nM
JF16 in DMSO	-	-	3.55 nM -	
RP14 in DMSO	-	-	94.48 nM	-
RP23 IN DMSO	187.51 nM	-	-	-
RP58 in DMSO	-	-	-	-
RP59 in DMSO	-	-	-	-
RA010115 in DMSO	9.47 nM	141.96 nM	-	-
RA010143 HCl in DMSO	-	-	-	-
RA010143 HCl in H2O	-	-	-	-
RA010146 in DMSO	-	-	-	-
RA010165 in DMSO	-	-	-	-
RA010168 in DMSO	-	-	-	-
RA010171 in DMSO	124.62 nM	83.44 nM	-	-
RA010900 HCl in DMSO	-	-	-	-
RA010900 HCl in H2O	152.77 nM	269.93 nM	-	-
RA013883 in DMSO	-	-	-	-

2.5. Discussione

**Caratterizzazione di nuovi HAT attivatori
per la terapia della malattia di Alzheimer**

La ricerca clinica di base è in continuo sviluppo, ma ad oggi le terapie proposte per la cura dell'Alzheimer hanno una limitata efficacia. Infatti, i trattamenti farmacologici che vengono impiegati in terapia sono volti ad alleggerire i sintomi della malattia, ma non sono in grado di ritardare o arrestarne la progressione (Kumar, Singh et al. 2015).

Per anni, la ricerca di nuovi farmaci per l'AD si è concentrata principalmente su terapie volte alla riduzione dei livelli cerebrali di A β (Schenk, Barbour et al. 1999, Nakagami, Nishimura et al. 2002, Walsh, Townsend et al. 2005). Tuttavia, nessun trial clinico al momento ha avuto successo (Doody, Thomas et al. 2014). Terapie farmacologiche in grado di incrementare l'acetilazione degli istoni, a valle dell'aumento dei livelli di A β , rappresentano un approccio alternativo, che non coinvolge il processing di APP.

Tra i meccanismi di controllo epigenetico l'acetilazione delle code istoniche riveste un ruolo fondamentale nei meccanismi di apprendimento e memoria (Levenson and Sweatt 2005). Esso determina un cambiamento nella conformazione della cromatina (Kouzarides 2007, Millan 2013) stimolando la trascrizione di geni fondamentali nei processi cognitivi (Levenson and Sweatt 2005). La strategia farmacologica piú comunemente studiata consiste nell'inibizione delle HDAC, gli enzimi deputati alla deacetilazione degli istoni. Tuttavia, la fonte di maggiore preoccupazione per queste molecole è la scarsa selettività che può determinare gravi effetti collaterali. A tale proposito il gruppo di ricerca dei Proff. Arancio e Landry della Columbia University si sono concentrati su un approccio alternativo, ossia l'attivazione delle HAT. A tale scopo hanno sintetizzato YF2, una molecola con buone caratteristiche farmacocinetiche e una buona permeabilità della barriera ematoencefalica. Tuttavia le proprietà chimico-fisiche non ottimali e la scarsa stabilità metabolica li hanno spinti a disegnare e sintetizzare dei derivati del YF2 al fine di migliorarne le caratteristiche.

Lo scopo del mio lavoro di questo progetto a cui ho preso parte, è stato quindi quello di caratterizzare l'attività di queste molecole al fine di identificare HAT attivatori con selettivi per p300/CBP, una famiglia di acetiltransferasi che svolge un ruolo chiave nei processi di apprendimento e memoria (Alarcon 2004, Levenson and Sweatt 2005, Maurice, Duclot et al. 2008, Caccamo, Maldonado et al. 2010).

In particolare ho testato l'attività di ciascun composto sull'acetilazione di due siti lisinici specifici dell'istone H3.3, nello specifico i siti H3K18 e H3K27.

Innanzitutto il saggio di acetilazione ci ha permesso di confermare l'attività attivatoria di YF2 su p300. Infatti YF2 è in grado di attivare l'acetilazione dell'istone H3 sia a livello della Lys 18 che della Lys 27, in maniera concentrazione-dipendente.

In seguito, i saggi effettuati sui nuovi composti, ci hanno permesso di rilevare HAT attivatori di entrambi i siti lisinici, come RA010115, RA010171 E RA010900 e HAT attivatori su uno solo dei due siti lisinici presi in esame, come JF9, che attiva l'acetilazione della sola Lys 18 e RP23 che attiva quella della Lys 27.

Tra la libreria di composti testati abbiamo rivelato anche degli HAT inibitori, in particolare JF1, JF5, JF7 e JF10 che inibiscono l'acetilazione di entrambe le lisine 18 e 27; JF3 e JF16 che inibiscono l'acetilazione della sola Lys 18 e JF6 e RP14 che inibiscono quella della Lys 27. I composti rimanenti invece non presentano alcun tipo di attività, ossia JF4, RP58, RP59, RA010143, RA010146, RA010165, RA010168 e RA013883.

E' interessante notare come le caratteristiche chimico-strutturali di ciascun composto rivestano un ruolo chiave nel tipo di attività che ne deriva. Infatti rilevanti modifiche a livello della molecola di YF2 possono addirittura invertire l'attività del composto (Fig.1).

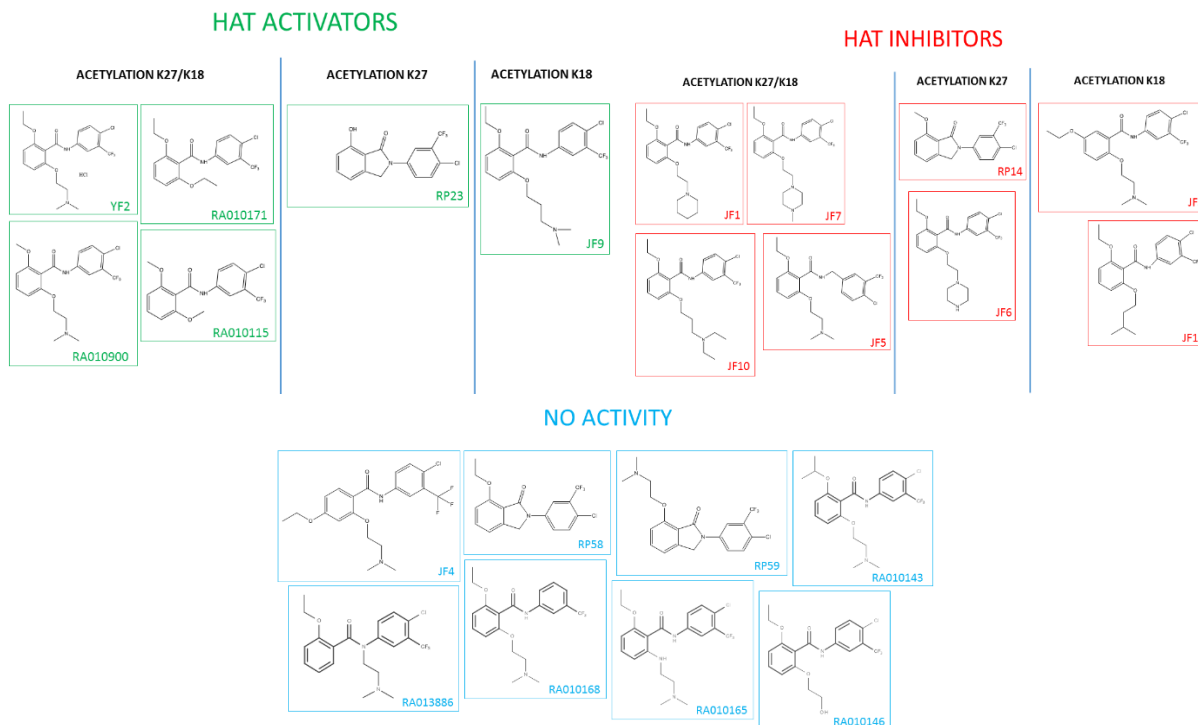


Fig.1

1. In particolare, la sostituzione del gruppo dimetilamminico presente sulla catena laterale del fenile, con un gruppo stericamente ingombrato, conferisce un'attività inibitoria dell'acetilazione di H3 su entrambe le lisine 27 e 18. Nello specifico, l'ingombro sterico viene conferito dalla presenza di: un nucleo piperidinico in JF1, un gruppo dietilamminico in JF10 e il gruppo N-metil-piperazinico in JF7. L'assenza del gruppo metilico sulla piperazina di JF6, conferisce alla molecola un'attività inibitoria sulla Lys 27.
2. L'attività HAT inibitoria è stata rilevata anche in quei composti ai quali sono state apportate modifiche strutturali che conferiscono rigidità alla molecola. In particolare, l'introduzione di un CH₂ tra il gruppo ammidico e l'anello benzenico in JF5 e la formazione dell'anello lattamico in RP14.

3. Tra i composti testati la serie degli “RP” presentano uno scaffold diverso da quello di YF2. Tra questi RP58 e RP59 non hanno rivelato alcuna attività e questo sembrerebbe dovuto non solo alla rigidità della molecola, ma anche alla presenza di sostituenti ingombranti a livello dell’ossidrile in posizione orto rispetto al gruppo ammidico. Invece, RP23 che presenta l’ossidrile libero ha un’attività di tipo HAT attivatoria. Questo sembrerebbe suggerire l’importanza della presenza di un gruppo polare in grado di formare un legame a idrogeno per una potenziale interazione a livello del sito attivo. Infatti, nello scaffold di YF2, la presenza del gruppo ammidico permette la formazione di legami a idrogeno, invece negli “RP” la chiusura dell’anello ne determina la perdita. Inoltre, a sostegno di questa ipotesi, è importante notare come anche RA013886, che presenta una sostituzione del gruppo ammidico, non ha alcuna attività.
4. Un’altra peculiarità di YF2 è la presenza di un sostituyente etil-etere in posizione orto (1,2) rispetto all’ammidico sull’anello benzenico. Lo spostamento di questo gruppo in meta (1,3) come in JF3, conferisce un’attività inibitoria dell’acetilazione della Lys 18. Quando spostato in para (1,4) come in JF4, il composto non presenta alcuna attività.
5. Tuttavia, la sostituzione dell’etil-etere con un metil-etere mantiene le caratteristiche attivatorie di YF2. Infatti, RA010900 così come RA010115 sono attivatori dell’acetilazione di entrambe le lisine 18 e 27.
- Al contrario la sostituzione con un gruppo ingombrante come quello isopropilico in RA010143, determina la perdita di ogni attività.
6. Infine, possiamo ipotizzare che la presenza del gruppo dimetilamminico non sia necessaria all’attività attivatoria, come dimostrano i composti RA010171 e RA010900, che ne sono privi.

Tra tutti i composti testati, quindi, quelli che risultano più promettenti sono:

- RA010900, sebbene presenti delle EC50 ($EC50_{K27} = 152.77 \text{ nM}$; $EC50_{K18} = 269.93 \text{ nM}$) elevate rispetto al YF2;
- RA010115 e RA010171 che invece hanno rivelato una buona EC50 rispettivamente per l'acetilazione della Lys 27 ($EC50_{K27} = 9.47 \text{ nM}$), e per quella della Lys 18 ($EC50_{K18} = 83.45 \text{ nM}$) migliori rispetto a quelle del YF2. E' inoltre interessante notare che RA010900 esplica la sua attività se disciolto in H_2O , ma non in DMSO. Questa caratteristica potrebbe conferire buone proprietà farmacocinetiche e migliorare quella che viene definita la "druggability" del target di interesse, ossia la capacità di un farmaco a modulare in maniera efficace il proprio bersaglio.

Questi composti sono stati selezionati, all'interno di una numerosa libreria che comprende circa 70 molecole, sulla base delle diverse scaffolds, o sulla base di specifiche sostituzioni ritenute rilevanti nelle caratteristiche chimico-farmaceutiche della molecola.

Il "goal" di questo progetto è quello di ottenere un HAT attivatore efficace, che presenti le caratteristiche positive di YF2, ossia un buon profilo tossicologico, buone proprietà farmacocinetiche e buona permeabilità a livello della barriera ematoencefalica ma, nello stesso tempo, superi quelli che sono i limiti di YF2, ossia le caratteristiche farmacodinamiche e la stabilità metabolica, ottenendo in tal modo un potenziale farmaco per la cura dell'AD.

Questi primi dati ottenuti sono molto promettenti, tuttavia sono necessarie ulteriori indagini che ci permettano di valutare le caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche di questi composti.

Bibliografia

Alarcon, J. M. (2004). "Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration." Neuron **42**: 947-959.

Allis, C. D., S. L. Berger, J. Cote, S. Dent, T. Jenuwien, T. Kouzarides, L. Pillus, D. Reinberg, Y. Shi, R. Shiekhata, A. Shilatifard, J. Workman and Y. Zhang (2007). "New nomenclature for chromatin-modifying enzymes." Cell **131**(4): 633-636.

Alzheimer, A., H. Forstl and R. Levy (1991). "On certain peculiar diseases of old age." Hist Psychiatry **2**(5 Pt 1): 71-101.

Andoh, T., C. C. Chiueh and P. B. Chock (2003). "Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates the expression of thioredoxin and thioredoxin peroxidase-1 during hormesis in response to oxidative stress-induced apoptosis." J Biol Chem **278**(2): 885-890.

Arancio, O., E. R. Kandel and R. D. Hawkins (1995). "Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons." Nature **376**(6535): 74-80.

Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte and B. T. Hyman (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." Neurology **42**(3 Pt 1): 631-639.

Atkins, C. M., J. C. Selcher, J. J. Petraitis, J. M. Trzaskos and J. D. Sweatt (1998). "The MAPK cascade is required for mammalian associative learning." Nature Neurosci **1**: 602-609.

Attar, A., C. Ripoli, E. Riccardi, P. Maiti, D. D. Li Puma, T. Liu, J. Hayes, M. R. Jones, K. Lichti-Kaiser, F. Yang, G. D. Gale, C. H. Tseng, M. Tan, C. W. Xie, J. L. Straudinger, F. G. Klarner, T. Schrader, S. A. Frautschy, C. Grassi and G. Bitan (2012). "Protection of primary neurons and mouse brain from Alzheimer's pathology by molecular tweezers." Brain **135**(Pt 12): 3735-3748.

Barondes, S. H. and M. E. Jarvik (1964). "The influence of actinomycin-D on brain RNA synthesis and on memory." J. Neurochem **11**: 187-195.

Beavo, J. A. (1995). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms." Physiol Rev **75**(4): 725-748.

Bender, A. T. and J. A. Beavo (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use." Pharmacological Reviews **58**(3): 488-520.

Bernabeu, R., P. Schmitz, M. P. Faillace, I. Izquierdo and J. H. Medina (1996). "Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning." Neuroreport **7**(2): 585-588.

Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.

Bollen, E., D. Puzzo, K. Rutten, L. Privitera, J. De Vry, T. Vanmierlo, G. Kenis, A. Palmeri, R. D'Hooge, D. Balschun, H. M. Steinbusch, A. Blokland and J. Prickaerts (2014). "Improved long-term memory via enhancing cGMP-PKG signaling requires cAMP-PKA signaling." Neuropsychopharmacology **39**(11): 2497-2505.

Bourtchouladze, R. (2003). "A mouse model of Rubinstein–Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4." Proc. Natl Acad. Sci. USA **100**: 10518-10522.

Bousiges, O., A. P. Vasconcelos, R. Neidl, B. Cosquer, K. Herbeaux, I. Panteleeva, J. P. Loeffler, J. C. Cassel and A. L. Boutillier (2010). "Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus." Neuropsychopharmacology **35**(13): 2521-2537.

Bredy, T. W., H. Wu, C. Crego, J. Zellhoefer, Y. E. Sun and M. Barad (2007). "Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear." Learn Mem **14**(4): 268-276.

Broadbent, N. J., S. Gaskin, L. R. Squire and R. E. Clark (2010). "Object recognition memory and the rodent hippocampus." Learn Mem **17**(1): 5-11.

Bruno, O., E. Fedele, J. Prickaerts, L. A. Parker, E. Canepa, C. Brullo, A. Cavallero, E. Gardella, A. Balbi, C. Domenicotti, E. Bollen, H. J. Gijssels, T. Vanmierlo, K. Erb, C. L. Limebeer, F. Argellati, U. M. Marinari, M. A. Pronzato and R. Ricciarelli (2011). "GEBR-7b, a novel PDE4D selective inhibitor that improves memory in rodents at non-emetic doses." Br J Pharmacol **164**(8): 2054-2063.

Caccamo, A., M. A. Maldonado, A. F. Bokov, S. Majumder and S. Oddo (2010). "CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(52): 22687-22692.

Cai, Z. X., H. S. Guo, C. Wang, M. Wei, C. Cheng, Z. F. Yang, Y. W. Chen, W. D. Le and S. Li (2016). "Double-Edged Roles of Nitric Oxide Signaling on APP Processing and Amyloid-beta Production In Vitro: Preliminary Evidence from Sodium Nitroprusside." Neurotox Res **29**(1): 21-34.

Canepa, E., C. Domenicotti, B. Marengo, M. Passalacqua, U. M. Marinari, M. A. Pronzato, E. Fedele and R. Ricciarelli (2013). "Cyclic adenosine monophosphate as an endogenous modulator of the amyloid-beta precursor protein metabolism." IUBMB Life **65**(2): 127-133.

Carlezon, W. A., Jr., R. S. Duman and E. J. Nestler (2005). "The many faces of CREB." Trends Neurosci **28**(8): 436-445.

Cazarim Mde, S., J. C. Moriguti, A. T. Ogunjimi and L. R. Pereira (2016). "Perspectives for treating Alzheimer's disease: a review on promising pharmacological substances." Sao Paulo Med J **134**(4): 342-354.

Cheng, I. H., K. Searce-Levie, J. Legleiter, J. J. Palop, H. Gerstein, N. Bien-Ly, J. Puolivali, S. Lesne, K. H. Ashe, P. J. Muchowski and L. Mucke (2007). "Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models." J Biol Chem **282**(33): 23818-23828.

Cohen, H. D. and S. H. Barondes (1966). "Further studies of learning and memory after intracerebral actinomycin-D." J. Neurochem **13**: 207-211.

Cole, S. L. and R. Vassar (2007). "The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1." Mol Neurodegener **2**: 22.

Cummings, J. L. (2004). "Alzheimer's disease." N Engl J Med **351**(1): 56-67.

Das, U., D. A. Scott, A. Ganguly, E. H. Koo, Y. Tang and S. Roy (2013). "Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway." Neuron **79**(3): 447-460.

Das, U., L. Wang, A. Ganguly, J. M. Saikia, S. L. Wagner, E. H. Koo and S. Roy (2016). "Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway." Nat Neurosci **19**(1): 55-64.

Daugherty, B. L. and S. A. Green (2001). "Endosomal sorting of amyloid precursor protein-P-selectin chimeras influences secretase processing." Traffic **2**(12): 908-916.

Delaere, P., C. Duyckaerts, C. Masters, K. Beyreuther, F. Piette and J. J. Hauw (1990). "Large amounts of neocortical beta A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person." Neurosci Lett **116**(1-2): 87-93.

Delvecchio, M., J. Gaucher, C. Aguilar-Gurrieri, E. Ortega and D. Panne (2013). "Structure of the p300 catalytic core and implications for chromatin targeting and HAT regulation." Nat Struct Mol Biol **20**(9): 1040-1046.

Dickson, D. W., H. A. Crystal, C. Bevana, W. Honer, I. Vincent and P. Davies (1995). "Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly." Neurobiol Aging **16**(3): 285-298; discussion 298-304.

Domek-Lopacinska, K. and J. B. Strosznajder (2008). "The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging." Brain Res **1216**: 68-77.

Doody, R. S., R. G. Thomas, M. Farlow, T. Iwatsubo, B. Vellas, S. Joffe, K. Kieburtz, R. Raman, X. Sun, P. S. Aisen, E. Siemers, H. Liu-Seifert and R. Mohs (2014). "Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease." N Engl J Med **370**(4): 311-321.

Fanselow, M. S., J. J. Kim, J. Yipp and B. De Oca (1994). "Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues." Behav. Neurosci **108**: 235-240.

- Fedele, E., D. Rivera, B. Marengo, M. A. Pronzato and R. Ricciarelli (2015). "Amyloid beta: Walking on the dark side of the moon." Mech Ageing Dev **152**: 1-4.
- Ferreira, S. T. and W. L. Klein (2011). "The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease." Neurobiol Learn Mem **96**(4): 529-543.
- Fischer, A., F. Sananbenesi, A. Mungenast and L. H. Tsai (2010). "Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders." Trends Pharmacol Sci **31**(12): 605-617.
- Fischer, A., F. Sananbenesi, X. Wang, M. Dobbin and L. H. Tsai (2007). "Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling." Nature **447**(7141): 178-182.
- Flood, J. F., E. L. Bennett, A. E. Orme and M. R. Rosenzweig (1975). "Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training." Physiol. Behav **14**: 177-184.
- Flood, J. F., E. L. Bennett, E. Orme and M. R. Rosenzweig (1975). "Relation of memory formation to controlled amounts of brain protein synthesis." Physiol. Behav **15**: 97-102.
- Forloni, G. (1996). "Neurotoxicity of beta-amyloid and prion peptides." Curr Opin Neurol **9**(6): 492-500.
- Francis, S. H., M. A. Blount and J. D. Corbin (2011). "Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions." Physiol Rev **91**(2): 651-690.
- Francis, Y. I., M. Fa, H. Ashraf, H. Zhang, A. Staniszewski, D. S. Latchman and O. Arancio (2009). "Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **18**(1): 131-139.
- Garcia-Osta, A. and C. M. Alberini (2009). "Amyloid beta mediates memory formation." Learn Mem **16**(4): 267-272.
- Gershey, E. L., G. Vidali and V. G. Allfrey (1968). "Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of epsilon-N-acetyllysine in the f2a1 histone." J Biol Chem **243**(19): 5018-5022.
- Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-890.
- Gong, B., O. V. Vitolo, F. Trinchese, S. Liu, M. Shelanski and O. Arancio (2004). "Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment." J Clin Invest **114**(11): 1624-1634.
- Goodman, R. H. and S. Smolik (2000). "CBP/p300 in cell growth, transformation, and development." Genes Dev **14**(13): 1553-1577.

Govindarajan, N., R. C. Agis-Balboa, J. Walter, F. Sananbenesi and A. Fischer (2011). "Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression." J Alzheimers Dis **26**(1): 187-197.

Graff, J. and I. M. Mansuy (2008). "Epigenetic codes in cognition and behaviour." Behav Brain Res **192**(1): 70-87.

Graff, J., D. Rei, J. S. Guan, W. Y. Wang, J. Seo, K. M. Hennig, T. J. Nieland, D. M. Fass, P. F. Kao, M. Kahn, S. C. Su, A. Samiei, N. Joseph, S. J. Haggarty, I. Delalle and L. H. Tsai (2012). "An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain." Nature **483**(7388): 222-226.

Graff, J. and L. H. Tsai (2013). "Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin." Nat Rev Neurosci **14**(2): 97-111.

Grant, P. A., A. Eberharter, S. John, R. G. Cook, B. M. Turner and J. L. Workman (1999). "Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes." J Biol Chem **274**(9): 5895-5900.

Guan, J. S., S. J. Haggarty, E. Giacometti, J. H. Dannenberg, N. Joseph, J. Gao, T. J. Nieland, Y. Zhou, X. Wang, R. Mazitschek, J. E. Bradner, R. A. DePinho, R. Jaenisch and L. H. Tsai (2009). "HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity." Nature **459**(7243): 55-60.

Gulisano, W., D. Maugeri, M. A. Baltrons, M. Fa, A. Amato, A. Palmeri, L. D'Adamio, C. Grassi, D. P. Devanand, L. S. Honig, D. Puzzo and O. Arancio (2018). "Role of Amyloid-beta and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade." J Alzheimers Dis **64**(s1): S611-S631.

Haass, C., M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B. L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schenk, D. B. Teplow and et al. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." Nature **359**(6393): 322-325.

Han, S. H. (2014). "Increasing burden of Alzheimer's disease by aging." J Korean Med Sci **29**(7): 885.

Hardy, J. and D. Allsop (1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease." Trends Pharmacol Sci **12**(10): 383-388.

Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.

Heckman, P. R., C. Wouters and J. Prickaerts (2015). "Phosphodiesterase inhibitors as a target for cognition enhancement in aging and Alzheimer's disease: a translational overview." Curr Pharm Des **21**(3): 317-331.

Herrup, K. (2015). "The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis." Nat Neurosci **18**(6): 794-799.

- Howlett, D. R., K. H. Jennings, D. C. Lee, M. S. Clark, F. Brown, R. Wetzel, S. J. Wood, P. Camilleri and G. W. Roberts (1995). "Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide." Neurodegeneration **4**(1): 23-32.
- Huang, Y., S. J. Myers and R. Dingleline (1999). "Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes." Nat Neurosci **2**(10): 867-872.
- Iversen, L. L., R. J. Mortishire-Smith, S. J. Pollack and M. S. Shearman (1995). "The toxicity in vitro of beta-amyloid protein." Biochem J **311** (Pt 1): 1-16.
- Kandel, E. R. (2012). "The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB." Mol Brain **5**: 14.
- Karran, E. and J. Hardy (2014). "Anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease--are we on the right road?" N Engl J Med **370**(4): 377-378.
- Katzman, R., R. Terry, R. DeTeresa, T. Brown, P. Davies, P. Fuld, X. Renbing and A. Peck (1988). "Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques." Ann Neurol **23**(2): 138-144.
- Kerppola, T. K. (2006). "Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells." Nat Protoc **1**(3): 1278-1286.
- Khochbin, S. (2011). "In the heart of a dynamic chromatin." Chem Biol **18**(4): 410-412.
- Kilgore, M., C. A. Miller, D. M. Fass, K. M. Hennig, S. J. Haggarty, J. D. Sweatt and G. Rumbaugh (2010). "Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." Neuropsychopharmacology **35**(4): 870-880.
- Kim, D., C. L. Frank, M. M. Dobbin, R. K. Tsunemoto, W. Tu, P. L. Peng, J. S. Guan, B. H. Lee, L. Y. Moy, P. Giusti, N. Broodie, R. Mazitschek, I. Delalle, S. J. Haggarty, R. L. Neve, Y. Lu and L. H. Tsai (2008). "Deregulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity." Neuron **60**(5): 803-817.
- Kim, D., M. D. Nguyen, M. M. Dobbin, A. Fischer, F. Sananbenesi, J. T. Rodgers, I. Delalle, J. A. Baur, G. Sui, S. M. Armour, P. Puigserver, D. A. Sinclair and L. H. Tsai (2007). "SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis." EMBO J **26**(13): 3169-3179.
- Kim, J. J., R. A. Rison and M. S. Fanselow (1993). "Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear." Behav Neurosci **107**(6): 1093-1098.
- Kirson, N. Y., U. Desai, L. Ristovska, A. K. Cummings, H. G. Birnbaum, W. Ye, J. S. Andrews, D. Ball and K. Kahle-Wroblewski (2016). "Assessing the economic burden of Alzheimer's disease patients first diagnosed by specialists." BMC Geriatr **16**: 138.

- Kleppisch, T. and R. Feil (2009). "cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour." Handb Exp Pharmacol(191): 549-579.
- Koppel, I. and T. Timmusk (2013). "Differential regulation of Bdnf expression in cortical neurons by class-selective histone deacetylase inhibitors." Neuropharmacology **75**: 106-115.
- Korzus, E., M. G. Rosenfeld and M. Mayford (2004). "CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation." Neuron **42**: 961-972.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Kraus, W. L., E. T. Manning and J. T. Kadonaga (1999). "Biochemical analysis of distinct activation functions in p300 that enhance transcription initiation with chromatin templates." Mol Cell Biol **19**(12): 8123-8135.
- Kumar, A., A. Singh and Ekavali (2015). "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update." Pharmacol Rep **67**(2): 195-203.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lawrence, J. L., M. Tong, N. Alfulaij, T. Sherrin, M. Contarino, M. M. White, F. P. Bellinger, C. Todorovic and R. A. Nichols (2014). "Regulation of presynaptic Ca²⁺, synaptic plasticity and contextual fear conditioning by a N-terminal beta-amyloid fragment." J Neurosci **34**(43): 14210-14218.
- Lee, E. B., B. Zhang, K. Liu, E. A. Greenbaum, R. W. Doms, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2005). "BACE overexpression alters the subcellular processing of APP and inhibits Abeta deposition in vivo." J Cell Biol **168**(2): 291-302.
- Lee, J. T. and W. Gu (2013). "SIRT1: Regulator of p53 Deacetylation." Genes Cancer **4**(3-4): 112-117.
- Lee, K. K. and J. L. Workman (2007). "Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(4): 284-295.
- Levenson, J. M. (2004). "A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-Rel." J. Neurosci **24**: 3933-3943.
- Levenson, J. M. (2004). "Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus." J. Biol. Chem **279**: 40545-40559.
- Levenson, J. M. and J. D. Sweatt (2005). "Epigenetic mechanisms in memory formation." Nat Rev Neurosci **6**(2): 108-118.
- Levy, E., M. D. Carman, I. J. Fernandez-Madrid, M. D. Power, I. Lieberburg, S. G. van Duinen, G. T. Bots, W. Luyendijk and B. Frangione (1990). "Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type." Science **248**(4959): 1124-1126.

- Li, X., L. Wu, C. A. Corsa, S. Kunkel and Y. Dou (2009). "Two mammalian MOF complexes regulate transcription activation by distinct mechanisms." Mol Cell **36**(2): 290-301.
- Liu, X., L. Wang, K. Zhao, P. R. Thompson, Y. Hwang, R. Marmorstein and P. A. Cole (2008). "The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator." Nature **451**(7180): 846-850.
- Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." Neuron **35**(4): 605-623.
- Lu, Y. F. and R. D. Hawkins (2002). "Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus." J Neurophysiol **88**(3): 1270-1278.
- Lu, Y. F., E. R. Kandel and R. D. Hawkins (1999). "Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus." J Neurosci **19**(23): 10250-10261.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." Nature **389**(6648): 251-260.
- Manning, E. T., T. Ikehara, T. Ito, J. T. Kadonaga and W. L. Kraus (2001). "p300 forms a stable, template-committed complex with chromatin: role for the bromodomain." Mol Cell Biol **21**(12): 3876-3887.
- Matsumoto, Y., J. C. Sandoz, J. M. Devaud, F. Lormant, M. Mizunami and M. Giurfa (2014). "Cyclic nucleotide-gated channels, calmodulin, adenylyl cyclase, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II are required for late, but not early, long-term memory formation in the honeybee." Learn Mem **21**(5): 272-286.
- Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." Physiol Rev **77**(4): 1081-1132.
- Maurice, T., F. Duclot, J. Meunier, G. Naert, L. Givalois, J. Meffre, A. Celerier, C. Jacquet, V. Copois, N. Mechti, K. Ozato and C. Gongora (2008). "Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice." Neuropsychopharmacology **33**(7): 1584-1602.
- Millan, M. J. (2013). "An epigenetic framework for neurodevelopmental disorders: from pathogenesis to potential therapy." Neuropharmacology **68**: 2-82.
- Monfort, P., M. D. Munoz, E. Kosenko and V. Felipo (2002). "Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase." J Neurosci **22**(23): 10116-10122.
- Morley, J. E., S. A. Farr, W. A. Banks, S. N. Johnson, K. A. Yamada and L. Xu (2010). "A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory." J Alzheimers Dis **19**(2): 441-449.

Mujtaba, S., Y. He, L. Zeng, S. Yan, O. Plotnikova, Sachchidanand, R. Sanchez, N. J. Zeleznik-Le, Z. Ronai and M. M. Zhou (2004). "Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation." Mol Cell **13**(2): 251-263.

Muller, U. C. and H. Zheng (2012). "Physiological functions of APP family proteins." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(2): a006288.

Nakagami, Y., S. Nishimura, T. Murasugi, I. Kaneko, M. Meguro, S. Marumoto, H. Kogen, K. Koyama and T. Oda (2002). "A novel beta-sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid beta-induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation in vitro." Br J Pharmacol **137**(5): 676-682.

Naslund, J., A. Schierhorn, U. Hellman, L. Lannfelt, A. D. Roses, L. O. Tjernberg, J. Silberring, S. E. Gandy, B. Winblad, P. Greengard and et al. (1994). "Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8378-8382.

Nguyen, P. V. and N. H. Woo (2003). "Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases." Prog Neurobiol **71**(6): 401-437.

O'Brien, R. J. and P. C. Wong (2011). "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease." Annu Rev Neurosci **34**: 185-204.

Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard and Y. Nakatani (1996). "The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases." Cell **87**(5): 953-959.

Oike, Y. (1999). "Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein–Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism." Hum. Mol. Genet **8**: 387-396.

Oliveira, A. M., M. A. Wood, C. B. McDonough and T. Abel (2007). "Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits." Learn Mem **14**(9): 564-572.

Onder, O., S. Sidoli, M. Carroll and B. A. Garcia (2015). "Progress in epigenetic histone modification analysis by mass spectrometry for clinical investigations." Expert Rev Proteomics **12**(5): 499-517.

Orejana, L., L. Barros-Minones, J. Jordan, E. Puerta and N. Aguirre (2012). "Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model." Neurobiol Aging **33**(3): 625 e611-620.

Pan, T., X. Li, W. Xie, J. Jankovic and W. Le (2005). "Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells." FEBS Lett **579**(30): 6716-6720.

Parthun, M. R., J. Widom and D. E. Gottschling (1996). "The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism." Cell **87**(1): 85-94.

Parvathy, S., I. Hussain, E. H. Karran, A. J. Turner and N. M. Hooper (1999). "Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells." Biochemistry **38**(30): 9728-9734.

Passer, B., L. Pellegrini, C. Russo, R. M. Siegel, M. J. Lenardo, G. Schettini, M. Bachmann, M. Tabaton and L. D'Adamio (2000). "Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor." J Alzheimers Dis **2**(3-4): 289-301.

Pearson, H. A. and C. Peers (2006). "Physiological roles for amyloid beta peptides." J Physiol **575**(Pt 1): 5-10.

Peleg, S., F. Sananbenesi, A. Zovoilis, S. Burkhardt, S. Bahari-Javan, R. C. Agis-Balboa, P. Cota, J. L. Wittnam, A. Gogol-Doering, L. Opitz, G. Salinas-Riester, M. Dettenhofer, H. Kang, L. Farinelli, W. Chen and A. Fischer (2010). "Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice." Science **328**(5979): 753-756.

Phillips, R. G. and J. E. LeDoux (1992). "Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning." Behav. Neurosci **106**: "274-285" # "1093.

Prickaerts, J., N. P. Van Goethem, W. Gulisano, E. K. Argyrousi, A. Palmeri and D. Puzzo (2017). "Physiological and pathological processes of synaptic plasticity and memory in drug discovery: Do not forget the dose-response curve." Eur J Pharmacol **817**: 59-70.

Prickaerts, J., W. C. van Staveren, A. Sik, M. Markerink-van Ittersum, U. Niewohner, F. J. van der Staay, A. Blokland and J. de Vente (2002). "Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat." Neuroscience **113**(2): 351-361.

Puzzo, D. and O. Arancio (2013). "Amyloid-beta peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?" J Alzheimers Dis **33 Suppl 1**: S111-120.

Puzzo, D., W. Gulisano, O. Arancio and A. Palmeri (2015). "The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Abeta physiology." Neuroscience **307**: 26-36.

Puzzo, D., C. Loreto, S. Giunta, G. Musumeci, G. Frasca, M. V. Podda, O. Arancio and A. Palmeri (2014). "Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on apoptosis and beta amyloid load in aged mice." Neurobiol Aging **35**(3): 520-531.

Puzzo, D., L. Privitera, M. Fa, A. Staniszewski, G. Hashimoto, F. Aziz, M. Sakurai, E. M. Ribe, C. M. Troy, M. Mercken, S. S. Jung, A. Palmeri and O. Arancio (2011). "Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory." Ann Neurol **69**(5): 819-830.

Puzzo, D., L. Privitera, E. Leznik, M. Fa, A. Staniszewski, A. Palmeri and O. Arancio (2008). "Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus." J Neurosci **28**(53): 14537-14545.

Puzzo, D., L. Privitera and A. Palmeri (2012). "Hormetic effect of amyloid-beta peptide in synaptic plasticity and memory." Neurobiol Aging **33**(7): 1484 e1415-1424.

Puzzo, D., A. Staniszewski, S. X. Deng, L. Privitera, E. Leznik, S. Liu, H. Zhang, Y. Feng, A. Palmeri, D. W. Landry and O. Arancio (2009). "Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model." J Neurosci **29**(25): 8075-8086.

Ragvin, A., H. Valvatne, S. Erdal, V. Arskog, K. R. Tufteland, K. Breen, O. Y. AM, A. Eberharter, T. J. Gibson, P. B. Becker and R. Aasland (2004). "Nucleosome binding by the bromodomain and PHD finger of the transcriptional cofactor p300." J Mol Biol **337**(4): 773-788.

Rahman, M. M., A. Kukita, T. Kukita, T. Shobuike, T. Nakamura and O. Kohashi (2003). "Two histone deacetylase inhibitors, trichostatin A and sodium butyrate, suppress differentiation into osteoclasts but not into macrophages." Blood **101**(9): 3451-3459.

Rampon, C. (2000). "Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice." Nature Neurosci **3**: 238-244.

Reitz, C. (2012). "Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review." Int J Alzheimers Dis **2012**: 369808.

Reneerkens, O. A., K. Rutten, H. W. Steinbusch, A. Blokland and J. Prickaerts (2009). "Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement." Psychopharmacology (Berl) **202**(1-3): 419-443.

Ricciarelli, R., C. Brullo, J. Prickaerts, O. Arancio, C. Villa, C. Rebosio, E. Calcagno, M. Balbi, B. T. van Hagen, E. K. Argyrousi, H. Zhang, M. A. Pronzato, O. Bruno and E. Fedele (2017). "Memory-enhancing effects of GEBR-32a, a new PDE4D inhibitor holding promise for the treatment of Alzheimer's disease." Sci Rep **7**: 46320.

Ricciarelli, R. and E. Fedele (2015). "Phosphodiesterase 4D: an enzyme to remember." Br J Pharmacol **172**(20): 4785-4789.

Ricciarelli, R. and E. Fedele (2017). "The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind." Curr Neuropsychopharmacol **15**(6): 926-935.

Ricciarelli, R., D. Puzzo, O. Bruno, E. Canepa, E. Gardella, D. Rivera, L. Privitera, C. Domenicotti, B. Marengo, U. M. Marinari, A. Palmeri, M. A. Pronzato, O. Arancio and E. Fedele (2014). "A novel mechanism for cyclic adenosine monophosphate-mediated memory formation: Role of amyloid beta." Ann Neurol **75**(4): 602-607.

Ricobaraza, A., M. Cuadrado-Tejedor, A. Perez-Mediavilla, D. Frechilla, J. Del Rio and A. Garcia-Osta (2009). "Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model." Neuropsychopharmacology **34**(7): 1721-1732.

- Ripoli, C., R. Piacentini, E. Riccardi, L. Leone, D. D. Li Puma, G. Bitan and C. Grassi (2013). "Effects of different amyloid beta-protein analogues on synaptic function." Neurobiol Aging **34**(4): 1032-1044.
- Roberson, E. D. and J. D. Sweatt (1999). "A biochemical blueprint for long-term memory." Learn. Mem **6**: 381-388.
- Roth, T. L. and J. D. Sweatt (2009). "Regulation of chromatin structure in memory formation." Curr Opin Neurobiol **19**(3): 336-342.
- Rutten, K., J. L. Basile, J. Prickaerts, A. Blokland and J. A. Vivian (2008). "Selective PDE inhibitors rolipram and sildenafil improve object retrieval performance in adult cynomolgus macaques." Psychopharmacology (Berl) **196**(4): 643-648.
- Rutten, K., J. Prickaerts, M. Hendrix, F. J. van der Staay, A. Sik and A. Blokland (2007). "Time-dependent involvement of cAMP and cGMP in consolidation of object memory: studies using selective phosphodiesterase type 2, 4 and 5 inhibitors." Eur J Pharmacol **558**(1-3): 107-112.
- Rutten, K., J. D. Vente, A. Sik, M. M. Ittersum, J. Prickaerts and A. Blokland (2005). "The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP levels in hippocampal slices." Behav Brain Res **164**(1): 11-16.
- Sanchez, R. and M. M. Zhou (2011). "The PHD finger: a versatile epigenome reader." Trends Biochem Sci **36**(7): 364-372.
- Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandevent, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games and P. Seubert (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." Nature **400**(6740): 173-177.
- Schott, J. M., N. C. Fox, C. Frost, R. I. Scahill, J. C. Janssen, D. Chan, R. Jenkins and M. N. Rossor (2003). "Assessing the onset of structural change in familial Alzheimer's disease." Ann Neurol **53**(2): 181-188.
- Selcher, J. C., E. J. Weeber, A. W. Varga, J. D. Sweatt and M. Swank (2002). "Protein kinase signal transduction cascades in mammalian associative conditioning." Neuroscientist **8**: 122-131.
- Selkoe, D. J. (1994). "Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein." Annu Rev Neurosci **17**: 489-517.
- Selkoe, D. J. and J. Hardy (2016). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years." EMBO Mol Med **8**(6): 595-608.
- Setter, S. M., J. L. Iltz, J. E. Fincham, R. K. Campbell and D. E. Baker (2005). "Phosphodiesterase 5 inhibitors for erectile dysfunction." Ann Pharmacother **39**(7-8): 1286-1295.

- Seubert, P., C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst and et al. (1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." Nature **359**(6393): 325-327.
- Shelton, C. C., Y. Tian, M. G. Frattini and Y. M. Li (2009). "An exo-cell assay for examining real-time gamma-secretase activity and inhibition." Mol Neurodegener **4**: 22.
- Shim, Y. S., C. U. Pae, S. W. Kim, H. W. Kim, J. C. Kim and J. S. Koh (2011). "Effects of repeated dosing with Udenafil (Zydena) on cognition, somatization and erection in patients with erectile dysfunction: a pilot study." Int J Impot Res **23**(3): 109-114.
- Shogren-Knaak, M., H. Ishii, J. M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie and C. L. Peterson (2006). "Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions." Science **311**(5762): 844-847.
- Silva, A. J., J. H. Kogan, P. W. Frankland and S. Kida (1998). "CREB and memory." Annu Rev Neurosci **21**: 127-148.
- Sloane, J. A., M. F. Pietropaolo, D. L. Rosene, M. B. Moss, A. Peters, T. Kemper and C. R. Abraham (1997). "Lack of correlation between plaque burden and cognition in the aged monkey." Acta Neuropathol **94**(5): 471-478.
- Smith, E. R., C. Cayrou, R. Huang, W. S. Lane, J. Cote and J. C. Lucchesi (2005). "A human protein complex homologous to the Drosophila MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16." Mol Cell Biol **25**(21): 9175-9188.
- Smith, E. R., A. Pannuti, W. Gu, A. Steurnagel, R. G. Cook, C. D. Allis and J. C. Lucchesi (2000). "The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation." Mol Cell Biol **20**(1): 312-318.
- Son, H., Y. F. Lu, M. Zhuo, O. Arancio, E. R. Kandel and R. D. Hawkins (1998). "The specific role of cGMP in hippocampal LTP." Learn Mem **5**(3): 231-245.
- Squire, L. R., C. A. Emanuel, H. P. Davis and J. A. Deutsch (1975). "Inhibitors of cerebral protein synthesis: dissociation of aversive and amnesic effects." Behav. Biol **14**: 335-341.
- Tamaoka, A., N. Sawamura, T. Fukushima, S. Shoji, E. Matsubara, M. Shoji, S. Hirai, Y. Furiya, R. Endoh and H. Mori (1997). "Amyloid beta protein 42(43) in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease." J Neurol Sci **148**(1): 41-45.
- Terry, R. D., E. Masliah, D. P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L. A. Hansen and R. Katzman (1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." Ann Neurol **30**(4): 572-580.
- Thatcher, G. R., B. M. Bennett and J. N. Reynolds (2005). "Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **2**(2): 171-182.

Thinakaran, G. and E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." J Biol Chem **283**(44): 29615-29619.

Tomita, A., M. Towatari, S. Tsuzuki, F. Hayakawa, H. Kosugi, K. Tamai, T. Miyazaki, T. Kinoshita and H. Saito (2000). "c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300." Oncogene **19**(3): 444-451.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Valor, L. M., M. M. Pulopulos, M. Jimenez-Minchan, R. Olivares, B. Lutz and A. Barco (2011). "Ablation of CBP in forebrain principal neurons causes modest memory and transcriptional defects and a dramatic reduction of histone acetylation but does not affect cell viability." J Neurosci **31**(5): 1652-1663.

Walsh, D. M., D. M. Hartley, Y. Kusumoto, Y. Fezoui, M. M. Condron, A. Lomakin, G. B. Benedek, D. J. Selkoe and D. B. Teplow (1999). "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates." J Biol Chem **274**(36): 25945-25952.

Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2007). "A beta oligomers - a decade of discovery." J Neurochem **101**(5): 1172-1184.

Walsh, D. M., M. Townsend, M. B. Podlisny, G. M. Shankar, J. V. Fadeeva, O. El Agnaf, D. M. Hartley and D. J. Selkoe (2005). "Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation." J Neurosci **25**(10): 2455-2462.

Walsh, D. M., B. P. Tseng, R. E. Rydel, M. B. Podlisny and D. J. Selkoe (2000). "The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain." Biochemistry **39**(35): 10831-10839.

Wang, J., C. Shan, W. Cao, C. Zhang, J. Teng and J. Chen (2013). "SCG10 promotes non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein by facilitating its trafficking to the cell surface." Hum Mol Genet **22**(24): 4888-4900.

Wang, Y. L., F. Faiola, M. Xu, S. Pan and E. Martinez (2008). "Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein." J Biol Chem **283**(49): 33808-33815.

Wang, Z., X. J. Zhang, T. Li, J. Li, Y. Tang and W. Le (2014). "Valproic acid reduces neuritic plaque formation and improves learning deficits in APP(Swe) /PS1(A246E) transgenic mice via preventing the prenatal hypoxia-induced down-regulation of neprilysin." CNS Neurosci Ther **20**(3): 209-217.

Wapenaar, H. and F. J. Dekker (2016). "Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes." Clin Epigenetics **8**: 59.

Wiley, J. C., J. S. Meabon, H. Frankowski, E. A. Smith, L. C. Schecterson, M. Bothwell and W. C. Ladiges (2010). "Phenylbutyric acid rescues endoplasmic reticulum stress-induced suppression of APP proteolysis and prevents apoptosis in neuronal cells." PLoS One **5**(2): e9135.

Wilkins, H. M. and R. H. Swerdlow (2017). "Amyloid precursor protein processing and bioenergetics." Brain Res Bull **133**: 71-79.

Wisniewski, T., J. Ghiso and B. Frangione (1994). "Alzheimer's disease and soluble A beta." Neurobiol Aging **15**(2): 143-152.

Yan, Y., S. Harper, D. W. Speicher and R. Marmorstein (2002). "The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate." Nat Struct Biol **9**(11): 862-869.

Yuan, H. and R. Marmorstein (2013). "Histone acetyltransferases: Rising ancient counterparts to protein kinases." Biopolymers **99**(2): 98-111.

Zeng, L., Q. Zhang, G. Gerona-Navarro, N. Moshkina and M. M. Zhou (2008). "Structural basis of site-specific histone recognition by the bromodomains of human coactivators PCAF and CBP/p300." Structure **16**(4): 643-652.

Zhang, J., J. Guo, X. Zhao, Z. Chen, G. Wang, A. Liu, Q. Wang, W. Zhou, Y. Xu and C. Wang (2013). "Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil prevents neuroinflammation, lowers beta-amyloid levels and improves cognitive performance in APP/PS1 transgenic mice." Behav Brain Res **250**: 230-237.

Zhang, Y. W., R. Thompson, H. Zhang and H. Xu (2011). "APP processing in Alzheimer's disease." Mol Brain **4**: 3.

Zhu, L., J. Y. Yang, X. Xue, Y. X. Dong, Y. Liu, F. R. Miao, Y. F. Wang, H. Xue and C. F. Wu (2015). "A novel phosphodiesterase-5 Inhibitor: Yonkenafil modulates neurogenesis, gliosis to improve cognitive function and ameliorates amyloid burden in an APP/PS1 transgenic mice model." Mech Ageing Dev **150**: 34-45.

Zhuo, M., Y. Hu, C. Schultz, E. R. Kandel and R. D. Hawkins (1994). "Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation." Nature **368**(6472): 635-639.

Pubblicazioni



Original Article

Investigating the amyloid-beta enhancing effect of cGMP in neuro2a cells

Elisa Calcagno^a, Francesca Caudano^a, Mario Passalacqua^a, Maria A. Pronzato^a, Ernesto Fedele^b, Roberta Ricciarelli^{a,*}^a Department of Experimental Medicine, University of Genoa, Genoa, Italy^b Department of Pharmacy and Center of Excellence for Biomedical Research, University of Genoa, Genoa, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Alzheimer's disease

Amyloid precursor protein

APP

Cyclic guanosine monophosphate

Vardenafil

ABSTRACT

Long-term potentiation (LTP) and the process of memory formation require activation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathways. Notably, recent evidence indicated that both cyclic nucleotides boost the production of amyloid-beta (Aβ) peptides. In particular, cAMP was shown to favor hippocampal LTP by stimulating the synthesis of the amyloid precursor protein APP, whereas cGMP was found to enhance LTP and to improve memory by increasing Aβ levels without affecting the expression of APP. The results of the present study substantiate that cGMP has a role in the endocytic pathway of APP and suggest a scenario where the cyclic nucleotide enhances the production of Aβ by favoring the trafficking of APP from the cell cortex to the endolysosomal compartment.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by memory loss and a chronic decline of cognitive functions. The main histopathological hallmark of AD is the cerebral accumulation of insoluble amyloid-beta (Aβ), a small self-aggregating peptide generated through sequential cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by β-secretase (BACE) and γ-secretase. The most common Aβ species contain 40 or 42 amino acids (Aβ₄₀ and Aβ₄₂, respectively) and although they have long been known to exert neurotoxic effects, a growing body of evidence supports the idea that they might play a physiological role in long-term potentiation (LTP) and memory (Puzzo et al., 2012; Ricciarelli and Fedele, 2017).

LTP is the electrophysiological correlate of synaptic plasticity (Bliss and Collingridge, 1993) and requires activation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/cAMP responsive element binding protein (CREB) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP)/protein kinase G (PKG)/CREB pathways (Frey et al., 1993; Lu et al., 1999). Consequently, therapeutic strategies aimed at increasing cerebral levels of cAMP and cGMP are receiving much attention for their potential effect on AD and other memory-related disorders. In this context, phosphodiesterase 4 and 5 (PDE4 and PDE5) inhibitors are promising candidates, as they inactivate the enzymes that degrade cAMP and cGMP, respectively (Heckman et al., 2015a; Ricciarelli and Fedele, 2015).

The two cyclic nucleotides seem to be differentially involved in the

process of memory formation. Activation of the cAMP/PKA/CREB pathway has been mainly associated with a long-lasting form of LTP (L-LTP) that requires protein synthesis and is related to the late memory consolidation process, whereas cGMP has been mostly involved in the transient early phase of LTP (E-LTP), which is independent from gene expression and protein synthesis (Frey et al., 1993; Barad et al., 1998). More recent evidence, however, suggests that either early or late LTP require both cyclic nucleotides (Bollen et al., 2014).

Intriguingly, both cAMP and cGMP have been found to boost the production of Aβ peptides. In particular, the cAMP enhancer rolipram, a specific PDE4 inhibitor, was shown to favor hippocampal LTP by stimulating the synthesis of APP and the consequent production of Aβ (Ricciarelli et al., 2014). On the other hand, more recent evidence indicated that also cGMP enhances LTP and improve memory by inducing the production of Aβ, but without affecting the expression of APP (Palmeri et al., 2017).

Here, in order to gain further mechanistic insights into the role played by cGMP in the production of Aβ, we evaluated the effect of vardenafil, a selective PDE5 inhibitor, on the amyloidogenic processing of APP.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatments

Mouse neuro2a (N2a) cells were grown in 50% Dulbecco modified

* Corresponding author at: Department of Experimental Medicine, University of Genoa, Via L.B. Alberti, 2, 16132, Genoa, Italy.
E-mail address: ricciarelli@medicina.unige.it (R. Ricciarelli).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mechagedev.2017.08.001>

Received 4 July 2017; Received in revised form 31 July 2017; Accepted 2 August 2017
Available online 05 August 2017

0047-6374/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Amyloid- β Peptide Is Needed for cGMP-Induced Long-Term Potentiation and Memory

Agostino Palmeri,^{1*} Roberta Ricciarelli,^{2*} Walter Gulisano,¹ Daniela Rivera,² Claudia Rebosio,² Elisa Calcagno,² Maria Rosaria Tropea,¹ Silvia Conti,⁷ Utpal Das,⁵ Subhojit Roy,^{5,6} Maria Adelaide Pronzato,² Ottavio Arancio,⁷ Ernesto Fedele,^{3,4} and Daniela Puzzo¹

¹Department of Biomedical and Biotechnological Sciences, Section of Physiology, University of Catania, 95123 Catania, Italy, ²Department of Experimental Medicine, Section of General Pathology, School of Medical and Pharmaceutical Sciences, University of Genoa, 16132 Genoa, Italy, ³Department of Pharmacy, Section of Pharmacology and Toxicology, School of Medical and Pharmaceutical Sciences, University of Genoa, 16148 Genoa, Italy, ⁴Center of Excellence for Biomedical Research, University of Genoa, 16132 Genoa, Italy, ⁵Department of Pathology and Department of Neurosciences, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093, ⁶Department of Pathology and Department of Neuroscience, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53705, and ⁷Department of Pathology and Cell Biology & The Taub Institute, Columbia University, New York, New York, 10032

High levels of amyloid- β peptide (A β) have been related to Alzheimer's disease pathogenesis. However, in the healthy brain, low physiologically relevant concentrations of A β are necessary for long-term potentiation (LTP) and memory. Because cGMP plays a key role in these processes, here we investigated whether the cyclic nucleotide cGMP influences A β levels and function during LTP and memory. We demonstrate that the increase of cGMP levels by the phosphodiesterase-5 inhibitors sildenafil and vardenafil induces a parallel release of A β due to a change in the approximation of amyloid precursor protein (APP) and the β -site APP cleaving enzyme 1. Moreover, electrophysiological and behavioral studies performed on animals of both sexes showed that blocking A β function, by using anti-murine A β antibodies or APP knock-out mice, prevents the cGMP-dependent enhancement of LTP and memory. Our data suggest that cGMP positively regulates A β levels in the healthy brain which, in turn, boosts synaptic plasticity and memory.

Key words: amyloid beta; APP; cGMP; long-term potentiation; memory; synaptic plasticity

Significance Statement

Amyloid- β (A β) is a key pathogenetic factor in Alzheimer's disease. However, low concentrations of endogenous A β , mimicking levels of the peptide in the healthy brain, enhance hippocampal long-term potentiation (LTP) and memory. Because the second messenger cGMP exerts a central role in LTP mechanisms, here we studied whether cGMP affects A β levels and function during LTP. We show that cGMP enhances A β production by increasing the APP/BACE-1 convergence in endolysosomal compartments. Moreover, the cGMP-induced enhancement of LTP and memory was disrupted by blockade of A β , suggesting that the physiological effect of the cyclic nucleotide on LTP and memory is dependent upon A β .

Introduction

Synaptic plasticity is a multifaceted property of the brain that dynamically modifies neuronal activity following adequate stim-

uli. Plastic changes have been related to learning and memory, defined as the ability of an organism to modify its behavior through experience and to retain this information over time. Molecular mechanisms underpinning synaptic plasticity and memory have been widely studied in the last decades and the scientific community has mostly focused on long-term potentiation (LTP), a form of long-lasting synaptic strengthening thought to be the electrophysiological correlate of memory. In this regard, it is well established that the second messengers cyclic adenosine

Received Nov. 22, 2016; revised June 1, 2017; accepted June 8, 2017.

Author contributions: A.P., R.R., M.A.P., O.A., E.F., and D.P. designed research; R.R., W.G., D.R., C.R., E.C., M.R.T., S.C., U.D., S.R., E.F., and D.P. performed research; R.R., W.G., M.R.T., E.F., and D.P. analyzed data; A.P., R.R., O.A., E.F., and D.P. wrote the paper.

This work was supported by the Alzheimer's Association (IRG-05-134220 to D.P.), the University of Catania (Progetto di Ricerca d'Ateneo to A.P.), the University of Genoa (Progetto di Ricerca d'Ateneo to E.F. and R.R.), and the National Institutes of Health (NS049442/NS050045 to O.A.).

The authors declare no competing financial interests.

*A.P. and R.R. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to either of the following: Daniela Puzzo, Department of Biomedical and Biotechnological Sciences, Section of Physiology, University of Catania, Via S. Sofia 89, 95123 Catania, Italy.

E-mail: danielpuzzo@phd.unict.it or Ernesto Fedele, Department of Pharmacy, Section of Pharmacology and Toxicology, University of Genoa, Viale Cembrane 4, 16148 Genoa, Italy. E-mail: fedele@dipt.unige.it.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3607-16.2017

Copyright © 2017 the authors 0270-6474/17/376926-12\$15.00/0

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Memory-enhancing effects of GEBR-32a, a new PDE4D inhibitor holding promise for the treatment of Alzheimer's disease

Received: 03 January 2017

Accepted: 13 March 2017

Published: 12 April 2017

Roberta Ricciarelli^{1,*}, Chiara Brullo^{2,*}, Jos Prickaerts^{3,*}, Ottavio Arancio^{4,*}, Carla Villa⁵, Claudia Reboisio⁵, Elisa Calcagno⁵, Matilde Balbi⁵, Britt T. J. van Hagen⁵, Eleonora K. Argyrousi^{3,4}, Hong Zhang⁴, Maria Adelaide Pronzato¹, Olga Bruno^{2,*} & Ernesto Fedele^{5,4,*}

Memory loss characterizes several neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease (AD). Inhibition of type 4 phosphodiesterase (PDE4) and elevation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) has emerged as a promising therapeutic approach to treat cognitive deficits. However, PDE4 exists in several isoforms and pan inhibitors cannot be used in humans due to severe emesis. Here, we present GEBR-32a, a new PDE4D full inhibitor that has been characterized both *in vitro* and *in vivo* using biochemical, electrophysiological and behavioural analyses. GEBR-32a efficiently enhances cAMP in neuronal cultures and hippocampal slices. *In vivo* pharmacokinetic analysis shows that GEBR-32a is rapidly distributed within the central nervous system with a very favourable brain/blood ratio. Specific behavioural tests (object location and Y-maze continuous alternation tasks) demonstrate that this PDE4D inhibitor is able to enhance memory in AD transgenic mice and concomitantly rescues their hippocampal long-term potentiation deficit. Of great relevance, our preliminary toxicological analysis indicates that GEBR-32a is not cytotoxic and genotoxic, and does not seem to possess emetic-like side effects. In conclusion, GEBR-32a could represent a very promising cognitive-enhancing drug with a great potential for the treatment of Alzheimer's disease.

Memory loss characterizes several neurodegenerative pathologies among which Alzheimer's disease (AD) certainly represents the most common form of dementia. At present, cognitive disorders cannot benefit from effective therapies which are urged, given their socioeconomic impact that is expected to increase dramatically in the near future.

Over the last 30 years, neuroscience research has consistently demonstrated that cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and its downstream effectors play a pivotal role in the molecular mechanisms underlying memory formation¹. Indeed, pharmacological and genetic manipulations aimed at stimulating the cAMP pathway have been shown to enhance cognition under physiological conditions and, more importantly from a translational point of view, to normalize memory in different experimental models of cognitive impairment, including transgenic AD animals.

¹Department of Experimental Medicine, Section of General Pathology, School of Medical and Pharmaceutical Sciences, University of Genoa, Via L. B. Alberti, 2, 16132 Genoa, Italy. ²Department of Pharmacy, Section of Medicinal Chemistry, School of Medical and Pharmaceutical Sciences, University of Genoa, Viale Benedetto XV, 3, 16132 Genoa, Italy. ³Department of Psychiatry and Neuropsychology, School for Mental Health and Neuroscience (MHeNS), Maastricht University, Universiteitssingel 50, 6229 ER Maastricht, The Netherlands. ⁴Department of Pathology & Cell Biology, Taub Institute for Research on Alzheimer's Disease and the Aging Brain, Columbia University, New York, NY 10032, USA. ⁵Department of Pharmacy, Section of Pharmacology and Toxicology, School of Medical and Pharmaceutical Sciences, University of Genoa, Viale Cembrano, 4, 16148 Genoa, Italy. ⁶Center of Excellence for Biomedical Research, University of Genoa, Viale Benedetto XV, 16132, Genoa, Italy. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.F. (email: fedele@difar.unige.it)